

## ⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-214189

⑫ Int. Cl.

C 12 P 13/14  
C 12 N 1/20  
15/00

識別記号

厅内整理番号  
A-7236-4B  
8515-4B  
A-8412-4B⑬ 公開 昭和63年(1988)9月6日  
※審査請求 未請求 発明の数 2 (全51頁)

⑭ 発明の名称 新規なグルタミン酸生産性コリネ型細菌及び該細菌を用いるレーグルタミン酸の製造方法

⑮ 特 願 昭62-47759

⑯ 出 願 昭62(1987)3月4日

⑰ 発明者 藤井 幹夫	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 発明者 中條 幸博	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 発明者 藤野 竜一郎	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 発明者 竹田 裕彦	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 発明者 深見 克哉	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 発明者 本町 武徳	宮崎県延岡市旭町6丁目4100番地 旭化成工業株式会社内
⑰ 出願人 旭化成工業株式会社	大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

最終頁に続く

## 明細書

## 1. 発明の名称

新規なグルタミン酸生産性コリネ型細菌及び該細菌を用いるレーグルタミン酸の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) グルタミン酸合成経路に関与するグルタミン酸生産性コリネ型細菌由来の酵素遺伝子のうち、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Iso citrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子を含む少なくとも2種の酵素遺伝子を含有する組換え体DNAを保有するグルタミン酸生産性コリネ型細菌。

(2) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子である特許請求の範囲第(1)項に記載のグルタミン酸生産性コリネ型細菌。

(3) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソク

エン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子およびアコニット酸ヒドラターゼ(Aconitate hydratase: A H) 遺伝子である特許請求の範囲第(1)項に記載のグルタミン酸生産性コリネ型細菌。

(4) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子およびクエン酸シンターゼ(Citrate synthase: C S) 遺伝子である特許請求の範囲第(1)項に記載のグルタミン酸生産性コリネ型細菌。

(5) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ(A H) 遺伝子およびクエン酸シンターゼ(C S) 遺伝子である特許請求の範囲第(1)項に記載のグルタミン酸生産性コリネ型細菌。

(6) グルタミン酸生産性コリネ型細菌がコリ

ネバクテリウム属細菌である特許請求の範囲第

1項から第(5)項記載のグルタミン酸生産性コ

## リネ型細菌。

(7) グルタミン酸生産性コリネ型細菌を培養して該細菌にL-グルタミン酸を生産せしめ、生成するL-グルタミン酸を該細菌の培養物から分離することからなる発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法において、該L-グルタミン酸生産性コリネ型細菌としてグルタミン酸合成経路に関与するグルタミン酸生産性コリネ型細菌由来の酵素遺伝子のうち、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子を含む少なくとも2種の酵素遺伝子を含有する組換え体DNAを保有するグルタミン酸生産性コリネ型細菌を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造方法。

(8) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子である特許請求の範囲第(7)項に記載のL-グルタミン酸の製造方法。

(9) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子およびアコニット酸ヒドラターゼ(Aconitate hydratase: A H) 遺伝子である特許請求の範囲第(7)項に記載のL-グルタミン酸の製造方法。

(10) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子およびクエン酸シンターゼ(Citrate synthase: C S) 遺伝子である特許請求の範囲第(7)項に記載のL-グルタミン酸の製造方法。

(11) 少なくとも2種の酵素遺伝子がグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(I C D H) 遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ(A H) 遺伝子およびクエン酸シンターゼ(C S) 遺伝子である特許請求の範囲第(7)項に記載のL-グルタミン酸の製造方法。

(12) グルタミン酸生産性コリネ型細菌がコ

リネバクテリウム属細菌であることを特徴とする特許請求の範囲第(7)項から第(11)項記載のL-グルタミン酸の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用技術分野)

本発明は遺伝子工学的手法により育種したグルタミン酸生産性コリネ型細菌と該細菌を用いるし-  
ー-グルタミン酸の製造方法に関する。

## (従来の技術)

L-グルタミン酸は調味料として幅広い用途があり、グルタミン酸生産性コリネ型細菌を培養して該細菌にL-グルタミン酸を生産せしめ、生成するL-グルタミン酸を該細菌の培養物から分離する発酵法により工業的に生産されている。発酵法により工業的にL-グルタミン酸を生産するのに用いられているグルタミン酸生産性コリネ型細菌としては、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属およびミクロバクテリウム属細菌が知られている。これらの細菌を用いてグルタミン酸を製造する際には、発酵終了時のL-グルタミン

酸の培地中への蓄積濃度を高めること、および使用原料(糖)当りのグルタミン酸の生成量(対糖収率)を向上させることが工業的に重要である。上記目的を達成するために、生産菌の育種改良が種々検討されている。たとえば、グルタミン酸のアナログ(筋肉類似体)またはグルタミン酸合成経路の各種中間体のアナログ等に耐性を示す菌株を作製することにより、各種酵素活性のフィードバック阻害や抑制の解除された菌株を育種する方法、またグルタミン酸合成経路の途中より分歧して副生産物の合成に向かう経路の酵素活性の低下した菌株を育種する方法等が試みられている。一方、グルタミン酸合成に関与する酵素の活性を強化することによりL-グルタミン酸の生産速度を高めるとともに効率良くL-グルタミン酸を生成させる試みも近年行われるようになり、この目的を達成するためにグルタミン酸の合成経路に関与する各種酵素遺伝子のクローニングが行われつつある。本発明者らは既にグルタミン酸生産性コリネ型細菌の一環であるコリネバクテリウム・

メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801株(微生物研究室第558号)のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(特願昭60-292584), イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(特願昭60-8158), アコニット酸ヒドラターゼ遺伝子(特願昭61-136083), クエン酸シンターゼ遺伝子(特願昭61-279888), およびオスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(特願昭61-104768)のクローニングに成功しており、これら遺伝子をそれぞれ單独で含むDNA断片とコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)のベクタープラスミドとの組換えプラスミドを各々構築後、形質転換によりコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)に移入して、各酵素活性がそれぞれ強化された菌株を各々作製することに成功し、これらの菌株を用いて発酵法によりL-グルタミン酸を製造することを試みた。

## (本発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、上記の各酵素活性がそれぞれ強

化された菌株を用いて発酵法により得られるL-グルタミン酸の生産量や収率についてはまだ十分に満足のいくものではなく、更にL-グルタミン酸の生産性を向上させることが望まれていた。しかしながら、L-グルタミン酸発酵においてその生産性を十分向上することのできる菌株については、これまでに報告された例がなかった。

## (問題点を解決するための手段および作用)

本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、グルタミン酸生合成経路に関与する酵素遺伝子のうち、少なくとも2種以上の酵素遺伝子を組換えDNA技術を用いることにより同時に強化した種々の菌株を作製することに成功し、これらの菌株を用いてグルタミン酸発酵を行ったところ、少なくともグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子といソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子を含む少なくとも2種以上のグルタミン酸生合成経路に関与するグルタミン酸生産性コリネ型細菌由來の酵素遺伝子

を含む組換え体DNAで形質転換された菌株を用いてグルタミン酸発酵を行なった場合には菌株を使用した場合に比較して培地中へのL-グルタミン酸の蓄積レベルのみならず対糖収率も著しく向上していることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、グルタミン酸生合成経路に関与するグルタミン酸生産性コリネ型細菌由來の酵素遺伝子のうち、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子を含む少なくとも2種の酵素遺伝子を含有する組換え体DNAを保有するグルタミン酸生産性コリネ型細菌が提供される。

また、本発明によれば、グルタミン酸生産性コリネ型細菌を培養する発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法において、グルタミン酸生産性コリネ型細菌としてグルタミン酸生合成経路に関与するグルタミン酸生産性コリネ型細菌由來の酵素

遺伝子のうち、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子を含む少なくとも2種の酵素遺伝子を含有する組換え体DNAを保有するグルタミン酸生産性コリネ型細菌を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造方法が提供される。

本発明において、グルタミン酸生合成経路に関与する酵素遺伝子として用いる遺伝子としては、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由來のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(Glutamate dehydrogenase: G D H) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase: I C D H) 遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ(Aconitate hydratase: A H) 遺伝子、およびクエン酸シンターゼ(Citrate synthase: C S) 遺伝子が挙げられる。本発明においては、L-グルタミン酸の生産性の点から、これらの酵素遺伝子のうち少なくともG D H遺伝子およびI C D H遺伝子を必ず含む2種

類以上の酵素遺伝子を組合わせて用いる。

本発明のグルタミン酸生産性コリニ型細菌は前記酵素遺伝子の少なくとも2種を含有する組換え体DNAを保有する細菌である。前記酵素遺伝子の少なくとも2種を含有する組換え体DNAは、前記酵素遺伝子の各々を含むDNA断片を複数可能なベクターに組み入れることによって得ることができる。複数可能なベクターとしては、グルタミン酸生産性コリニ型細菌の宿主-ベクター系で用いられるベクター。例えば、プラスミドpAG1、プラスミドpAG3、プラスミドpAG50及びそれらのプラスミドより由来するプラスミドなどが挙げられる。

前述の各酵素遺伝子を含むDNA断片は、通常の公知の宿主-ベクター系を用いてグルタミン酸生産性コリニ型細菌から分離することができる。用いることのできる宿主-ベクター系の宿主としては、例えば、大腸菌〔エシュリヒア・コリ(*Escherichia coli*)〕が挙げられる。大腸菌としては例えばエシュリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K

ウム・SDS処理とフェノール・クロロホルム処理)により行うことができる。全DNAの切断に用いる制限酵素としては、上記細菌の全DNAを適当に切断でき、かつ本目的に使用する大腸菌、枯草菌又はグルタミン酸生産性コリニ型細菌等のベクターの開裂に用いることができる制限酵素であればいずれも使用可能である。この際用いる制限酵素が目的遺伝子の内部を切断するかどうかは事前に不明なので適当な条件で制限酵素を弱く作用させ、DNAを部分的に分解することにより目的遺伝子を完全に含む様な適当な大きさのDNA断片が得られる。

(2) ベクターDNAを制限酵素で切断・閉鎖させる。ベクターDNAの開裂は、ベクターDNAに適当な制限酵素を充分作用させることにより行なう。

(3) ベクターDNAの開裂部位に(1)で得たDNA断片を組み込ませ、閉鎖した組換え体DNAをつくる。ベクターDNAの開裂部位にDNA断片を組み込ませるには、公知の常法例えばマニアテ

12株及びその変異株を挙げることができる。その大腸菌又はその変異株を宿主として用いる宿主-ベクター系において使用するベクターとしては上記大腸菌又はその変異株を形質転換するために通常用いられる公知のプラスミドを挙げができる。また、宿主-ベクター系として枯草菌の宿主-ベクター系。例えば、バチルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)168の変異株を宿主として、そして該細菌に適合するプラスミドをベクターとして用いる宿主-ベクター系や、グルタミン酸生産性コリニ型細菌を宿主として、そして該細菌に適合するプラスミドをベクターとして用いる宿主-ベクター系を用いることもできる。グルタミン酸生産性コリニ型細菌由來のG DH遺伝子、IC DH遺伝子、AH遺伝子及びCS遺伝子をそれぞれ含むDNA断片は以下のようにして得ることができる。

(1) グルタミン酸生産性コリニ型細菌の菌体より全DNAを抽出し、制限酵素で切断する。全DNAの抽出は、通常用いられている方法(リゾチ

イスらの方法〔ティー・マニアティス、イー・エフ・フリッチュ、ジェイ・サンブルック:モレキユラークローニング アラボラトリー マニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー エヌ・ワイ・1982(T.Maniatis,E.F.Fritsch,J.Sambrook:Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor N.Y.1982)〕を用いることができる。

(4) 組換え体DNAを宿主に移入する。宿主となる菌株は、目的遺伝子をクローニングした場合宿主の表現型に変化が現れるものであれば、いずれでも用いることができる。一般には、その様な変異株を使用する必要がある。たとえば、G DH遺伝子をクローニングする場合には、宿主となる菌株はG DH活性を欠損している必要がある。同様に、IC DH遺伝子、AH遺伝子及びCS遺伝子をそれぞれクローニングする場合には、各々宿主としてはIC DH、AH及びCS活性を欠損している必要がある。そうすれば宿主はグルタミン

能を生育の為に要求する。従って、例えばG DH遺伝子のクローニングの場合前述のG DH欠損株を用いると外来的G DH產生遺伝子を含むDNA断片が移入されると、その宿主はグルタミン酸を生育に要求しなくなり他と識別することができる。G DH欠損株を育種する場合には細菌をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG)を用いて、公知の常法に従って変異処理し、さらに公知の常法に従ってL-グルタミン酸要求株を分離し、それらの酵素活性測定試験を経て、G DH欠損株を取得することができる。NTG変異処理の代りに、他の公知の変異誘導法〔例えば、紫外線照射、X線照射、その他の変異誘起剤処理、挿入配列(Insertion sequence: IS)やトランスポゾン(Transposon)による変異誘導等〕を用いることもできる。ICDH欠損株、AH欠損株、CS欠損株についても同様の方法により得ることができる。また、研究者や公的機関より分譲されたG DH欠損株、ICDH欠損株、AH欠損株及

びCS欠損株を使用することもできる。宿主に選定した菌株が、制限能を有している場合には、その宿主にベクターDNAを一旦移入し、得られた形質転換株より調製したベクターDNAを前記(2)で用いる必要がある。組換え体DNAの移入は、公知の方法例えばマンデルらの方法(マンデル、エム..、ヒガ、エイ.: ジェイ.モル.バイオル., 53巻158-162頁1970年[Mandel, M., Higa, A.: J. Mol. Biol., 53, 158-162(1970)])あるいはチャングとコーエンの方法(チャング、エス..、コーエン、エス.エヌ.: モレキュラーアンドジェネラルジエネティクス、168巻111-115頁、1979年[Chang, S., Cohen, S.N.: Mol. Gen. Genet., 168, 111-115 (1979)])のプロトプラストを用いる方法によって行なうことができる。

(5) 得られた形質転換体の中から目的遺伝子を有する菌株を選択分離する。上記の工程によって得られる菌株の中で目的遺伝子を有するものはごくわずかなので目的とする菌株を選択する必要がある。一次選択方法としては、目的遺伝子が移入

された菌株の表現型の変化を検出できる培地で前記(4)で得られた菌体を常法通り培養する。その結果予定の変化の現れた菌体を選択分離することができる。前記の宿主でG DH产生遺伝子をクローニングする場合には、グルタミン酸無添加成培地上で生育する菌株を選択する。最終的に目的遺伝子をクローニングした菌株を選択するには目的遺伝子の産物の有無を調べる。その結果により目的の菌株が選択できる。目的遺伝子が酵素遺伝子の場合にはその酵素活性を測定する。G DH产生遺伝子をクローニングする場合には、グルタミン酸無添加成培地で生育した菌株について、それらの細胞抽出液を用いて常法によりG DH活性を測定する。その結果、G DH活性を有する形質転換株を分離し、該株を培養することによりG DH产生遺伝子を含むDNA断片をクローニングすることができる。ICDH遺伝子、AH遺伝子及びCS遺伝子をクローニングする場合は、それぞれICDH活性、AH活性及びCS活性を測定して、各活性をそれぞれ有する形質転換株を分離す

る以外は上記と同様の方法によりそれぞれの遺伝子を含むDNA断片をクローニングすることができる。

目的の酵素遺伝子を含むDNA断片は、上述のようにして得られる形質転換株から次のようにして分離することができる。まず、得られた形質転換体から該DNA断片を含有する組換え体DNAを公知の常法によって分離する。次に得られた組換え体DNAを制限酵素で処理して、ベクターDNAと目的の酵素遺伝子を含むDNA断片とに切断し、次にこれらの制限酵素処理試料を、アガロースゲル電気泳動に供する。その後、目的の分子の長さを有するDNA断片を含むアガロースゲルを切り出し、それぞれのアガロースゲルを溶かした後、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿により、目的の酵素遺伝子を含むDNA断片を分離することができる。

このようにして得られるG DH遺伝子、ICDH遺伝子、AH遺伝子及びCS遺伝子をそれぞれ

含むDNA断片を用いて本発明の細菌を調製することができる。本発明の細菌を調製は下記の方法によって行うことができる。

(1) グルタミン酸生合成経路に固有する前記酵素遺伝子即ちG DH遺伝子、IC DH遺伝子、AH遺伝子及びCS遺伝子をそれぞれ含有するDNA断片は前述したように、それらの遺伝子を含む組換え体DNAをそれぞれ該組換え体DNAを保持する形質転換株から分離生成する。組換え体DNAの分離は、該菌株を適当な培地で培養後公知の常法たとえば塩化セシウムとエチゾウムプロマイドを用いた密度勾配超遠心法により行うことができる。

(2) まずG DH遺伝子とIC DH遺伝子を同時に保有した組換え体DNAを作製する。この場合、前述のように目的の酵素遺伝子を含む組換え体DNAから上記酵素遺伝子をそれぞれ含むDNA断片を分離し、上記酵素遺伝子を各々含有するDNA断片を前述の複数可能な発現ベクターに同時にあるいは順次組入れて目的とする組換え体DNA

を作製することができる。また、既にどちらか一方の酵素遺伝子を含んだ前記(1)項で得られる組換え体DNAをベクターとして新たに付加すべき他方の酵素遺伝子を含むDNA断片を該組換え体の適当な制限酵素切断部位に組込むこともできる。この場合に用いる制限酵素は、組込むべき遺伝子を含む断片を切り出すことができ、かつベクタープラスミドの機能発現や既に組み込まれている酵素遺伝子の発現に影響を与えない部分を切断し閉鎖させるようなものを選択する必要がある。組込むべきDNA断片と開裂したベクタープラスミドDNAを混合後、T4-DNAリガーゼでこれらを結合させ組換え体DNAを調製し、これを宿主菌であるグルタミン酸生産性コリネ型細菌に移入する。DNAの宿主菌への移入は、プロトプラストを用いる形質転換法により行うことができる。得られた形質転換株の中に全て目的の組換え体DNAが含まれているとは限らないので、複数個の形質転換株からそれぞれ組換え体DNAを抽出後、それらの構造を制限酵素を用いた解析によ

り決定する。目的の組換え体DNAは、数十個から数百個の形質転換株を調べることにより分離することができる。

(3) 目的の組換え体DNAを保持する形質転換株について、確認のために組換え体DNA上の各遺伝子の形質発現を調べる。形質発現は、形質転換株の目的とする各酵素活性を、組換え体DNAを保持しない宿主菌の酵素活性と比較することでき簡単に調べることができる。

以上のようにして、G DH遺伝子及びIC DH遺伝子の2種の酵素遺伝子を含む組換え体DNAを保有するグルタミン酸生産性コリネ型細菌が得られる。

(4) このようにして得られた本発明の組換え体DNAを前記工程(2)においてベクターとして用いて、前記(1)から(3)までの操作を繰返してAH遺伝子を含むDNA断片および/またはCS遺伝子を含むDNA断片を更に組入れることにより、少なくともG DHとIC DHを含む2種乃至4種の酵素が同時に強化された本発明の菌

株(以下しばしば多重強化株と称する)を構築することができる。

以下に代表的な例として、コリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801(微生物研究会第558号)を上記酵素遺伝子のDNA供与体および宿主として用いた場合の多重強化株の作製につき詳しく説明する。

多重強化株を作製する際の材料となる組換えプラスミドとして、G DH遺伝子を含むpAG1001、IC DH遺伝子を含むpAG3001、AH遺伝子を含むpAG5001、およびCS遺伝子を含むpAG4003等が挙げられる。これらプラスミドの制限酵素による切断点地図は第1図から第4図に示されている通りであり、グルタミン酸生産性コリネ型細菌のベクタープラスミドpAG50の中にそれぞれG DH遺伝子を含む断片、IC DH遺伝子を含む断片、AH遺伝子を含む断片、またはCS遺伝子を含む断片が組込まれたものである。ベクタープラスミドpAG50は本発明者らが特開昭61-104791で示したプラスミドであり、また各種遺伝子を含む組換え

プラスミドの詳細もそれぞれ特願昭60-292584 (G D H)、特願昭60-8158 (I C D H)、特願昭61-136083 (A H) および特願昭61-279888 (C S) に本発明者らによって記述されている。尚、これらのプラスミドは後述の実施例に記載の方法によって調製することができる。最終的に構築されるべき組換え体DNAで、本発明のグルタミン酸生産性コリネ型細菌が保有する組換え体DNAの例としては、後述のプラスミドpIG101, pAIG321, pCIG231, pCAIG4等が挙げられる。pIG101はpAG50にグルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のG D H遺伝子とI C D H遺伝子が同時に組込まれたものである。pAIG321は同時にA H遺伝子、I C D H遺伝子およびG D H遺伝子が同時に組込まれたものである。また、pCIG231は同時にC S, I C D H, G D Hの3種の酵素の遺伝子がpAG50に同時に組込まれたものである。さらにpCAIG4はpAG50にC S, A H, I C D H, およびG D Hの4種の酵素の遺伝子が同時に組込まれたものである。これらプラスミドを用いてグルタミン酸生産性コリ

ネ型細菌を宿主として形質転換することにより、本発明のグルタミン酸生産性コリネ型細菌である目的の多重強化株を得ることができる。上記組換えプラスミドpIG101, pAIG321, pCIG231, pCAIG4に限らず、グルタミン酸生産性コリネ型細菌のうち宿主ベクター系として用いられているものであるならば該菌株をDNA供与菌としてかつ組換え体DNAの宿主として使用することで上記と同様の多重強化株が作製し得ることは明白である。本発明のグルタミン酸生産性コリネ型細菌の宿主としては、上記のコリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801株及びその他のコリネバクテリウム属に属する細菌、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する細菌およびミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属に属する細菌を用いることができる。

このようにして得られた本発明の多重強化株を用いてグルタミン酸発酵を行なってL-グルタミン酸を製造する方法は、公知の従来のグルタミン酸生産菌を使用する場合とほとんど同じである。

すなわちグルコース、シュークロース等の糖類もしくは糖類を含有したデンプンの加水分解物または糖蜜、エタノール等のアルコール類、酛酸等の有機酸を炭素源として、またアンモニアや尿素等を窒素源として使用し、その他の副原料としてビオチンやチアミン等のビタミン類、リン酸またはリン酸化合物、無機金属塩等を添加した培地で培養すれば良い。また組換え体DNAの脱落を防止するのに必要に応じて抗生素等の薬剤（複製可能なベクターとして用いられるベクタープラスミドに耐性因子としてコードされているもの）を添加しても良い。培養を行う装置としては試験管やフラスコ、ジャーファーメンター等が使用可能であり工業化スケールで運転することも当然可能である。しかしながら、実験室レベルで各種菌株のL-グルタミン酸生産能力を比較する場合には、pHの自動調整ができ、かつ原料の炭素源や窒素源を培養途中で容易に補給することのできるジャーファーメンターを用いることが望ましい。グルタミン酸発酵においては、培地中に適量のL-グル

タミン酸を蓄積させる為に微生物の膜透性を良くする必要があるが、これも公知の従来の方法と同じく培地中のビオチン濃度を制御する方法、培養途中にベニシリソウや界面活性剤等の薬剤を添加する方法が有効である。用いる培地のpHは通常6.0~8.0、好ましくは7.0~7.5である。

本発明の製造方法において、本発明のグルタミン酸生産性コリネ型細菌の培養を行なう際の温度は25~38°C、好ましくは30~40°Cであり、主培養として20~50時間、好ましくは28~36時間培養を行なう。培養の方法としては好気的であればよく、振盪培養でも通気搅拌培養でもよい。培養により、培養液中に本発明のグルタミン酸生産性コリネ型細菌の発酵作用によってL-グルタミン酸が蓄積される。

培養終了後、得られる培養発酵液からL-グルタミン酸を単離する。L-グルタミン酸を培養液から単離する方法としては、公知の常法で行なうことができる。例えば、菌体を遠心分離等で除去した後、イオン交換樹脂を用いる方法、等電点分析

する方法等公知の方法で効率良く単離することができる。

以下実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明が以下の実施例に限定されるものでないことは云うまでもない。

(以下余白)

#### (実施例)

##### 実施例1

本実施例では、グルタミン酸生産性コリネ型細菌で、G D H と I C D H の活性が同時に強化された2重強化株を作製した例を示す。

G D H 遺伝子およびI C D H 遺伝子を含む組換えプラスミドとしてそれぞれpAG1001およびpAG50 01を使用した。これらプラスミドはそれぞれCorynebacterium melassecola 801菌由来のG D H 遺伝子を含む約5.4Kb (キロベース)のEcoRI断片がCorynebacterium melassecola 801菌のベクタープラスミドpAG50のEcoRI切断部位に組込まれたもの、およびCorynebacterium melassecola 801由来のI C D H 遺伝子を含む約3.3KbのSalI断片が上述のプラスミドpAG50のSalI切断点に組込まれたものである。Corynebacterium melassecola 801は微生物工業技術研究所(微工研)に微工研条寄55号として寄託されている。組換えプラスミドの作製は全て前述のCorynebacterium melassecola 801を宿主菌として使用した。

#### (1) 組換えプラスミドpAG1001の調製

(1)コリネバクテリウム・メラセコラ(Corynebacterium melassecola)801 (微工研条寄第558号)からの全DNAの調製とその切断  
糖蜜培地(ビート糖蜜液30g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/l、尿素8g/l、リン酸1.5g/l、を含む水溶液をpH 6.2に調整後120°C、15分間殺菌して調製する)100mlに、コリネバクテリウム・メラセコラ(Corynebacterium melassecola)801(微工研条寄第558号)を播種し、32°Cにて一晩振盪培養した。得られた培養液より菌体を集め、洗浄した後、10mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTAの緩衝液8mlに懸濁した。これにリゾチウムを最終濃度5mg/mlになるように加え、37°Cにて4時間反応させた。これにプロナーゼE(シグマ社、米国より購入)を最終濃度200μg/mlになるように加え、室温で15分間反応させた。その後、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度1%になるように添加して37°Cにて1時間反応させた。反応終了後、反応液と等量の

TNE緩衝液(50mM Tris-HCl、5mM EDTA、100mM NaCl、pH 8.0)で鯨和したフェノールを加え混合した後、10000 rpm(11000 g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層にフェノール・クロロホルム(1:1、v/v)液を等量加えて混合の後、10000 rpm(11000 g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層に等量のクロロホルムを加えて混合の後、10000 rpm(11000 g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層にリボスクレアーゼA(シグマ社、米国より購入)を最終濃度40μg/mlになる様に加えて37°Cにて1時間反応させた。反応終了後、1/5容の5M NaCl水溶液と1/4容の50%ポリエチレンギリコール6000水溶液を添加混合し、4°Cにて4時間保持した。次に試料を5000 rpm(2700 g)で20分間遠心分離し、沈殿を回収した。得られた沈殿をTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH 7.5)4mlに溶かし、酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加えて、2倍量のエタノー

ルを添加した。得られた混合物を搅拌の後、-30℃にて3時間保持し、10000 rpm(11000 g)で20分間遠心分離し沈殿を回収した。得られた沈殿を減圧乾燥の後、TE緩衝液2mlに溶解し、DNA濃度0.85 μg/mlの全DNA溶液を得た。

DNAの切断のためには、34 μgのDNAに對して、160単位の制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社より購入)を加え、50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液6.7 ml中で37℃にて30分間反応を行なわせた。その後、70℃で10分間加熱して、反応を停止させた。

#### (2)ベクターpBR325の調製と開裂

エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340を5.0 mlのL-プロス(ポリペプトン10 g/l、酵母エキス5 g/l、NaCl 5 g/l、pH 7.2)に植菌し、37℃にて菌濃度 $5 \times 10^8$  / mlまで増殖させた後、2℃で凍結した。得られた菌体を5.0 mlの氷冷した100 mM NaCl水溶液に懸濁した。得られた懸濁液から菌体を集め後更に懸濁した。

1.5% (v/v) シューケロース、50 mM Tris-HCl(pH 8.5)、50 mM EDTA、2 mg/ml リゾチウム(シグマ社製、米国社より購入)よりなる水溶液2 mlに懸濁し、37℃にて30分間反応させた。次にトリトン(Triton)溶液[0.1% (v/v) トリトン(Triton) X-100、50 mM Tris-HCl、50 mM EDTA、pH 8.5] 2 mlを加えて、37℃にて30分間保持した。次にこの溶液を、5℃にて30000 rpm(64000 g)で1時間遠心分離し上清を回収し、この上清にTE緩衝液を加えて18 mlとした。この液に、1.0 mg/mlのエチジウムプロマイド水溶液1.2 mlと塩化セシウム16.4 gとを加えて静かに溶解し、40000 rpm(100000 g) 15℃で48時間遠心分離した。ベクターpBR325は、紫外線照射により遠心チューブ中、2本のバンドの下方として見い出され、このバンドを遠心チューブの側壁から注射器で抜き取ることにより、ベクターpBR325両分を得た。次にこの分画液を等容量のイソプロピルアルコールで4回抽出してエチジウムプロマイドを除去し、

に25 mlの氷冷した100 mM CaCl<sub>2</sub>水溶液に懸濁した。懸濁液を氷中で30分間保持した後、懸濁液から菌体を集め再度5 mlの氷冷した100 mM CaCl<sub>2</sub>水溶液に懸濁し、氷中で1時間保持した。得られた菌懸濁液200 μlに、0.1 μgのpBR325 DNA(ベセスダリサーチラボラトリー社製、米国)を添加して、氷中で1時間保持した。その後42℃にて2分間保持した後、5 mlのL-プロスを添加して、37℃にて90分間静置培養した。得られた培養液を無菌水で適宜希釈して、10 μg/mlのテトラサイクリンを含有するL-寒天培地(L-プロスに1.5 g/mlの寒天を添加した培地)に塗布し、37℃で一晩培養し、プラスミドpBR325で形成転換した大腸菌を得た。

ベクターパBR325を保持したエシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340を、100 mlのテトラサイクリン(1.0 μg/ml)を含むL-プロスに植菌し、37℃にて一晩培養した。同培養液より集めし、TE緩衝液で洗浄後

その後にTE緩衝液に対して透析して、DNA濃度1.30 μg/mlのプラスミドpBR325の透析完了液1 mlを得た。

プラスミドpBR325 DNA 1.7 μgを含む量の上記透析完了液に対して40単位の制限酵素EcoRIを加えて、50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液1.5 ml中で37℃にて2時間反応させた。

その後、70℃で10分間加熱して、反応を停止させた。この反応液に酢酸ナトリウムを最終濃度3.00 mMになる様に加え、更に2倍容のエタノールを添加して、-30℃にて3時間保持した。次に12000 rpm(8900 g)で室温で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した。乾燥した沈殿をBAPT緩衝液[50 mM Tris-HCl(pH 8.4)] 200 μlに溶解し、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ(Bacterial alkaline phosphatase)(宝酒造株式会社より購入)を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。更に同じ酵素を1単位添加して、65℃

で30分間反応させた。その後反応液に等容のTNE緩衝液で希釈したフェノールを加え、混合した後、12000 rpm (8900 g)で室温で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一度同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム (1:1, v/v) 液を添加して混合した後、12000 rpm (8900 g)で室温で10分間遠心分離し、水層を回収した。更に水層に等容のクロロホルムを添加して振拌した後、12000 rpm (8900 g)で室温で10分間遠心分離し、水層を回収した。該水層に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、更に2倍容のエタノールを添加し振拌した後、-30°Cにて3時間保持した。その後、12000 rpm (8900 g)で10分間遠心分離し、DNA沈澱を回収した。これを減圧乾燥した後、23 μlのTE緩衝液で溶解した。

### (3) DNAの組換え反応

実施例1工程(1)のDNA 2.4 μgと前記実施例1工程(2)のDNA 1.4 μgと3単位のT4ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購

入)とを、50 mMトリス(Tris)-HCl(pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mMジチオトレイトル(Dithiothreitol)、1 mMスペルミジン(Spermidine)、1 mM ATP、0.1 mg/ml ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin, 以下しばしばBSAと略す)(ベセスグリサーチラボラトリー社、米国より購入)の緩衝液100 μl中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。

### (4)組換えプラスミドの大腸菌への移入

前記工程(2)の方法により、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340のコンピテント細胞(Competent cell)を調製した。コンピテント細胞懸濁液400 μlと前記工程(3)の反応液40 μlとを混合して、氷中に1時間保持した。

その後、42°Cにて2分間加熱した後、5 mlのレーブロスを添加して37°Cにて90分間静置培養した。次に、得られた培養液から菌体を集め、無菌水に懸濁した。得られた懸濁液を、合成寒天

培地(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM, グルコース 2 g/l, 寒天 15 g/l, L-スレオニン 0.3 mM, L-ロイシン 0.3 mM, L-ヒスチジン 0.1 mM, L-アルギニン 0.6 mM, チアミン 0.05 mM)に塗布して培養した。

### (5)コリネバクテリウム・メラセコラ801

(*Corynebacterium melassecola* 801)(微生物研究会第558号)のGDH産生遺伝子を有する大腸菌の選択分離

前記実施例1工程(4)で得られた菌体を、クロラムフェニコール(20 μg/ml)とテトラサイクリン(10 μg/ml)とを含む前記合成寒天培地と、テトラサイクリン(10 μg/ml)のみを含む前記合成寒天培地とでそれぞれ培養し、生育の有無を調べた。クロラムフェニコール感受性テトラサイクリン耐性グルタミン酸非要求性を示す大腸菌の細胞を分離した。分離した細胞は目的のGDH産生遺伝子を保持しており、これをエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340 (pAG103)

と命名した。分離した大腸菌を培養してGDPH産生遺伝子をクローニングした。

分離した大腸菌のGDPH活性を、下記の方法で測定することにより、クローニングした遺伝子がGDPH産生遺伝子であることを確認した。合成液体培地(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6 g/l, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.61 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 10 mg/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mg/l, グルコース 4 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 3 g/l, L-スレオニン 0.3 mM, L-ロイシン 0.3 mM, L-ヒスチジン 0.1 mM, L-アルギニン 0.6 mM, チアミン 0.05 mM, pH 7.2)100 mlに、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340 (pAG103)を植菌し、37°Cで一日培養した。該大腸菌を集め後、2 mlのTM緩衝液(50 mMトリス(Tris)-HCl, 10 mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.6)に懸濁した。これを超音波処理した後、14000 rpm (20000 g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗胞液)を調製した。尚、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340やエシェリヒア・コリ(*Escherichia*

coli) K12 PA340 (pBR325)を培養する場合には、前記合成液体培地に、10 mM グルタミ酸ナトリウムを添加した。

GDH活性は、2.5 mMの酵素反応液(50 mM Tris-HCl、40 mM NH<sub>4</sub>Cl、0.25 mM NADPH、5 mM α-ケトグルタル酸、1.0～1.00 μg細胞抽出液、pH 7.6)の340 nm の吸光度の減少を、日立製作所製分光光度計(228型)で測定することにより求めた。また細胞抽出液の蛋白質濃度の測定にはローリー(Lowry)ら(オー・エイチ・ローリー(O.H. Lowry), エヌ・ジェイ・ローウェブロー(N.J. Rovewbrough), アール・ジェイ・ランダル(R. J. Randall), ジェイ・バイオル・ケム(J. Biol. Chem.) 193巻 265頁(1951年))の方法を用いた。尚、上記測定の標準蛋白質として、牛血清アルブミン(和光純薬工業社より購入)を用いた。

結果を第1表に示す。

第1表

菌株	gdh	GDH比活性 <sup>①</sup>
PA340 <sup>②</sup>	—	0.009
PA340(pBR325)	—	0.003
PA340(pAG103)	+	20.8
PA340(pAG112)	+	28.9

注: (1)反応液中の蛋白質 1 mgが、1分間に酸化した還元型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form, 以下NADPHと略す)の量(マイクロモル)で表示してある。

(2)イー・コリ ジェネティック ストックセンター(E. coli Genetic Stock Center), (デパートメント オブ ヒューマン ジェネティックス、エール ユニバーシティ、スクール オブ メジシン、333、シーダー ストリート、ビー・オー・ボックス 3333、ニュー・ヘイブン、コネチカット 06510、アメリカ合衆

国(Department of Human Genetics, Yale University, School of Medicine, 333 Cedar Street P.O. Box 3333, New Haven, Connecticut 06510 U.S.A.))のバーバラ ジェイ バッカマン(Barbara J. Bachmann)より分譲されたエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 の変異菌株である。尚、上記標識からは、誰でも菌株の分譲を受けることができる。本菌株は、GDHとグルタミン酸合成酵素とを共に欠損している。

第1表のGDH比活性測定結果より、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340 (pAG103)は、極めて高いGDH比活性を有していた。

(6)複合プラスミド pAG103の分離と解析  
プラスミド pBR325で形質転換されたエシェリヒア・コリ K12 PA340株の代わりにエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 PA340 (pAG103)を用いる以外は前記工程(1)-(2)と実験的に同じ方法でプラスミド pAG103のDNAを分

離精製して 150 μgのプラスミド pAG103のDNAを得た。このDNAから各々 0.3 μgの試料を調製しこれに、各々10単位の制限酵素EcoRI, BamHI, BglII, HindIII(ニッポンジーン社より購入), PstI(ベセダリサーチラボラトリ一社、米国より購入), SacI(宝酒造株式会社より購入), SalI(ニッポンジーン社より購入), XbaI(ニッポンジーン社より購入), KhoI(宝酒造株式会社より購入)を単独でおよび組合せて、それぞれの適正緩衝液20 μl中にて37℃で2時間反応させた。その消化した試料をマニアティスら(T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook; Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y. P.150-185, 1982)の方法により、1%(v/v)アガロースゲル電気泳動、および4%(v/v)ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動の終ったゲルを1 μg/μlエチジウムプロマイド水溶液に浸漬して30分間染色した後、紫外線をゲルに照射して生成したDNA断片に対応するバンドの数を判定し、各

断片の泳動距離から各々の分子の長さを算出した。尚、分子の長さは、アガロースゲル電気泳動の場合は同一アガロースゲル上で同時に電気泳動したラムダファージ(1 phage)DNA(ニッポンジーン社より購入)の制限酵素HindIIIによる消化によって得られる既知の分子の長さ断片の泳動距離との比較により、またポリアクリルアミドゲル電気泳動の場合は同一ポリアクリルアミドゲル上で同時に電気泳動したファイエックス174ファージ(ΦX174 phage)DNAの制限酵素HaeIIIによる消化によって得られる既知の分子の長さの断片(ベセスダリサーチラボラトリー社、米国より購入)の泳動距離との比較により算出した。更に、複数の制限酵素処理によって生じた消化断片を解析することにより、プラスミド分子中の各制限酵素切断部位を決定した。この様にして得られたプラスミドpAG103の制限酵素切断地図を第1図に示す。各DNA断片の分子長さ決定には、約1.0kb以上の分子長さについては1%アガロースゲル電気泳動を用い、約0.1kbから約1.0kb未満の分子長さにつ

いては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

その結果、プラスミドpAG103は、ベクターpBR325の制限酵素EcoRI切断部位に約5.4キロベースの外来のEcoRI断片が組込まれていた。このEcoRI断片が、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物研究会第558号)由来のGDH産生遺伝子を含むDNA断片である。

プラスミドpAG103 DNAをプラスミドpBR325の代わりに用いる以外は前記実施例1工程(2)と実質的に同様の方法でエシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 PA340を形質転換して形質転換体を得た。得られた形質転換体を薬剤耐性及び栄養要求性に関して調べた結果、調べた形質転換株は、全てテトラサイクリン耐性アンビシリソ耐性クロラムフェニコール感受性グルタミン酸非要求性であった。更に、該形質転換株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制

限酵素切断模式で同一と判定されるプラスミドであった。

#### (7) GDH産生遺伝子を含む約5.4キロベースのDNA断片の分離

前記実施例1工程(5)で調製したプラスミドpAG103のDNA 2.0 μgに対して、100単位の制限酵素EcoRI、SmaIをそれぞれ加えて、50mMトリス(Tris)-HCl(pH 7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaClの緩衝液1.00 μl中で、37°Cにて2時間反応させた。消化して得られた試料は、ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー社、米国より購入したLMPアガロース(Agarose)を使用し、4°Cで電気泳動を行なう以外は前記と同様の方法により、1%アガロースゲル電気泳動に供した。次に、アガロースゲルをエチジウムプロマイドで染色して紫外線照射下に置き、GDH産生遺伝子を含む約5.4キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。切り出したアガロースゲルにその重量の3倍量のTE緩衝液を加えて、65°Cで10分間保持し、アガロ

ースゲルを完全にTE緩衝液に溶解した。次に、等容のフェノールを添加して、攪拌の後、水層を回収した。該水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して、攪拌の後、水層を回収した。得られた水層に等容のクロロホルムを添加して、攪拌の後、水層を回収した。得られた水層に酢酸ナトリウムを最終濃度3.00mMになるように添加し、更に2倍容のエタノールを加えて攪拌の後、-30°Cにて3時間保持した。その後、10000 rpm(9000 g)で室温で10分間遠心分離して、DNAの沈殿を回収した。次に、得られた沈殿を減圧乾燥後、GDH産生遺伝子を含む約5.4キロベースのDNA断片を約2 μg取得した。

(以下余白)

(8) プラスミドpAG50の作成と該プラスミド保有コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 801(pAG50)からの該プラスミドの分離

プラスミドpAG50は、次の方法で作成した。先ずプラスミドpAG1を縮小化してプラスミドpAG14を作成し、該プラスミドよりテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片を分離した。次に該DNA断片をプラスミドpAG3に組込んでプラスミドpAG50を作成した。以下、上述の操作について詳細に説明する。

① コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 22243 (微生物研究寄第560号) 菌体からのプラスミドpAG1の分離

上記菌株を、半合成培地 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g, 尿素 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 50 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 400 mg, MnSO<sub>4</sub>·4-H<sub>2</sub>O 2 mg, FeSO<sub>4</sub>·4-H<sub>2</sub>O 2 mg, グルコース 20 g, ビオチン 50 μg, チアミン塩酸塩 200 μg, 酵母エキス 1 g] を純水に溶かして10倍とし、pH 7.2に調整した培地] で、

エタノールを添加搅拌して、5分間室温に置き、20℃で10分間、10,000 rpm(11,000 g)の遠心分離を行い沈殿を得た。得られた沈殿を、70% (v/v) エタノール水溶液で洗浄の後減圧乾燥して、TE緩衝液 [10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5] 20 mL 中に溶解した。この液に、10 mg/mL エチジウムプロマイド水溶液 1.2 mL と塩化セシウム 23.6 g を加えて静かに溶解し、40,000 rpm(100,000 g) 15℃で48時間遠心分離した。紫外線照射により遠心チューブ中、2本のバンドが見出され、下方のバンドを遠心チューブの側壁から注射器で抜き取ることにより、プラスミドpAG1を得た。次いでこの分離液を等容量のイソプロピルアルコールで4回抽出してエチジウムプロマイドを除去し、その後にTE緩衝液に対して透析して、DNA濃度 50 μg/mL のプラスミドpAG1の透析完了液 1 mL を得た。プラスミドpAG1を前記工程(1)-(6)の方法により解析して制限酵素切断地図を作成した。結果を第2図に示す。

② プラスミドpAG1の試験管内DNA粗抽出

32℃、1喫振搗培養し、得られた培養液 8 mL を 200 mL の前記半合成培地に移植して、32℃で5時間振搗培養した。

培養液から菌体を集め、リゾチウム液 (50 mMグルコース、10 mM EDTA, 25 mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン[Tris(hydroxymethyl)-aminomethane:Tris], 10 mg/mL リゾチウム(シグマ社、米国より購入), pH 8.0) 10 mL に懸濁し42℃で1時間反応させた。本反応液にアルカリ-ドデシル硫酸ナトリウム(Sodium Dodecyl-sulfate 以下 SDSと略す)液 [0.2 N NaOH, 1% (v/v) SDS] 20 mL を添加搅拌の後、氷中に5分間置いた。次に本反応液に、氷冷した酢酸カリウム溶液 (5 M 酢酸カリウム水溶液 60 mL, 酢酸 11.5 mL, 純水 28.5 mL の混合液) 15 mL を添加搅拌の後、氷中に10分間置いて溶菌物を得た。溶菌物の全量を遠心管に移し、4℃、5分間、12,000 rpm (13000 g) の遠心分離を行い、上澄液を回収した。これを等容のフェノール・クロロホルム液 (1:1) で抽出して水層を回収した。これに2倍容の

前記工程(8)-①で調製したプラスミドpAG1のDNA 0.5 μg に対して10単位の制限酵素EcoRIを加え、50 mM トリス(Tris)-HC<sub>l</sub> (pH 7.4), 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl の緩衝液 40 μL 中で、37℃にて2時間反応させた。その後70℃で10分間加熱して反応を停止させた。この反応液 20 μL と3単位のT4ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購入)とを、50 mM トリス(Tris)-HC<sub>l</sub> (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM デヒオトリアイトール(Dithiothreitol), 1 mM スペルミジン(Spermidine), 1 mM ATP, 0.1 mg/mL BSA (ベセスダリサーチラボラトリー社、米国より購入)の緩衝液 50 μL 中で15℃にて1喫反応させた。

③ プラスミドpAG14の取得

(プラスミドのキュアリング)

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 22243 (微生物研究寄第560号) を LCO 培地 (トリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, NaCl 5 g, グルコース 2 g) を純水に

溶かして1%とし、pH7.2に調整した培地)5mLに一白金耳植菌して、37℃で1営振盪培養した。この培養液を無菌水で希釈してLG寒天培地(LG培地に1.5重量%の寒天を添加した培地)に塗布し、32℃で2日間培養した。生じたコロニー100個を取り、テトラサイクリン10μg/mLを含有するLG寒天培地に約菌した。32℃で2日間培養して2株のテトラサイクリン感受性株を選択した。得られた2株のテトラサイクリン感受性株について、前記と同様なプラスミドの単離法によりプラスミドpAGIの存在を調べた。その結果得られた2株のテトラサイクリン感受性株は、いずれもプラスミドを保持していないプラスミドキューード(Plasmid-cured)株であった。これらの一方の株を以後の形質転換実験の宿主として用いた。(形質転換)

コリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 22243 (株工研桑寄第560号) より前記の操作で分離したプラスミドキューード株を、前記半合成培地で32℃、12

時間振盪培養し、その培養液0.5mLを同じ半合成培地50mLに植菌して32℃で振盪培養した。日立製作所製分光光度計(228型)で波長660nmにおける吸光度(O.D.)を測定し、O.D.が0.2になった時点で培養液にペニシリングを0.3単位/mLの濃度になるように添加した。添加後更に32℃で1.5時間培養を続けた。

その培養液より集菌し、R培地〔グルコース5g、カザミノ酸10g、酵母エキス10g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.35g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.15g、シュークロース137g、N-トリス(ハイドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES:N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid)5.73g、MgCl<sub>2</sub>0.95g、CaCl<sub>2</sub>1.11gを純水に溶かして1%とし、NaOHでpH7.2に調整した培地〕5mLに懸濁した。この菌懸濁液4.5mLに、3%/mL濃度のリゾチウムを含有するR培地(ミリボアフィルターで除菌した)0.5mLを添加して、35℃で5時間静置し反応させてプロトプラス化細胞を得た。反応混合物を7,000 rpm(4500 g)

で5℃で7分間遠心分離してプロトプラス化した細胞を回収し、R培地5mLに懸濁した。同様の操作を更にもう一度行った後、R培地5mLに再懸濁してプロトプラス懸濁液とした。

前記工程(8)-①で得られたリガーゼ反応液50μLと2倍濃度TSMC液(TSMC液は、TES 25mM、シュークロース0.4M、MgCl<sub>2</sub>10mM、CaCl<sub>2</sub>30mMを含み、NaOHでpH7.2に調整した水溶液である)50μLとの混合液を上記プロトプラス懸濁液0.5mLに添加混合した。その後更にPEG液(TSMC液にポリエチレンギリコール6,000(Polyethylene glycol 6000)を40%(v/v)濃度に溶解する)1.5mLを添加してゆるやかに混和し、2分間室温で静置した。その後R-PVP液(R培地にポリビニルピロリドン(PVP:Polyvinyl pyrrolidone)40g/Lを添加する)5mLを添加して、4,000 rpm(1800 g)で室温で10分間遠心分離して上澄液を除去した。同様の遠心分離条件で洗浄操作を更にもう一度行いプロトプラスを沈殿として得た。得られたプロトプラス

を0.5mLのR-PVP液にゆるやかに懸濁した。得られた懸濁液を3時間、30℃に保った後、R-PVP液で希釈し、希釈懸濁液を得た。一定量の希釈懸濁液をテトラサイクリン10μg/mL濃度を含む再生培地に植菌した。再生培地はR培地にPVP 40g/L、寒天15g/Lを添加して得られる下層寒天培地と、その上に重層された、PVP 40g/L、寒天8g/Lを添加して得られる上層寒天培地とからなる重層寒天培地である。植菌はプロトプラス懸濁液を溶けた上層寒天培地3mLと混合して、下層寒天培地上に重層することにより行なった。植菌した再生培地を32℃で4日間培養してテトラサイクリン耐性形質転換株を得た。

出現したテトラサイクリン耐性形質転換株から任意に10株を選び、テトラサイクリン10μg/mL濃度を含むLG寒天培地上で純化した後、工程(8)-①でプラスミドpAGIを分離した方法と実質的に同様の方法により、各菌株からプラスミドを分離した。各プラスミドDNA 0.5μgに対し

て前記工程(6)の方法により、各プラスミド中の制限酵素切断部位を決定した。その結果、プラスミドpAG14を取得した。このようにして得られたプラスミドpAG14の制限酵素切断地図を第3図に示す。

このプラスミドDNAを用いて、前記と実質的に同様な方法で、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)22243(微生物研究会第560号)のプラスミドキュアード株を形質転換した。得られたテトラサイクリン耐性株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて、制限酵素切断様式で同一と判定されるプラスミドであった。

#### ④プラスミドpAG14からのテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片の分離

前記工程(8)-④で調製したプラスミドpAG14のDNA $20\mu g$ に対して、100単位の制限酵素BamHI、BglIIを同時に加えて、10 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、50 mM NaCl、1 mM

タノールを添加して3時間保持した。その後、10,000 rpm(9,000 g)で室温で10分間遠心分離して、DNAの沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した。

#### ⑤プラスミドpAG3の調製と制限酵素BamHI処理

前記工程(8)-①の方法により、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)22220(微生物研究会第559号)から分離精製したプラスミドpAG3のDNA $4\mu g$ に対して、20単位の制限酵素BamHIを加えて、10 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、50 mM NaCl、1 mM ジチオトレイトル(Dithiothreitol)の緩衝液100 mM中で、37°Cにて2時間反応させた。そこへ等容のフェノール・クロロホルム(1:1)液を添加して振拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して振拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになるように加え、次に2倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保

持した後、12,000 rpm(8900 g)で室温で10分間遠心分離してDNAの沈殿を回収し、これを減圧乾燥した。尚、プラスミドpAG3の制限酵素切断地図を第4図に示す。

#### ⑥プラスミドpAG50の取得

前記工程(8)-④及び⑤で調製した夫々のDNA全量と3単位のT4ファージDNAリガーゼとを50 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオトレイトル(Dithiothreitol)、1 mM スペルミジン(Spermidine)、1 mM ATP、0.1 mg/ml BSAを含む緩衝液50 mM中で、15°Cにて一晩反応させた。その後70°Cにて10分間加熱して反応を停止させた。

得られたりガーゼ反応液50 μlを用いて、前記工程(8)-①と同じ形質転換操作によりコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物研究会第558号)のテトラサイクリン耐性形質転換株を取得した。ただし、再生培地による培養は、7日間とした。得られたテトラサイクリン耐性形質転換株について、前記工程

(8)の方法により、各株の保有するプラスミドを分離し、前記工程(6)の方法によりそれぞれのプラスミドを解析した。得られたプラスミドをpAG50と命名した。

このプラスミドDNAを用いて、前記と実質的に同様の方法で、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物研条寄第558号)を形質転換してテトラサイクリン耐性形質転換体を得た。得られたテトラサイクリン耐性形質転換体について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制限酵素切断模式で同一と判定されるプラスミドであった。得られたプラスミドpAG50の制限酵素切断地図を第5図に示す。

(9) プラスミドpAG50へのG DH産生遺伝子を含むDNA断片の組込み

前記工程(8)-⑩で調製したプラスミドpAG50のDNA 5 μgに対して、制限酵素EcoRIを15単位加えて、50 mM Tris(HCl)(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClを含む緩衝液50 μl中で

37°Cにて2時間反応させた。その後、70°Cで10分間加熱して、反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、更に2倍量のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保持した。次に12,000 rpm(8,900 g)で室温で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した。得られた試料をBAPT緩衝液(50 mM Tris(HCl)(pH8.4))200 μlに溶解し、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ(Bacterial alkaline phosphatase)(宝酒造株式会社より購入)を1単位添加して65°Cにて30分間反応させた。更に核酸素を1単位添加して、65°Cにて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で希釈したフェノールを加え、混合した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう1回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離し、水層を回収した。更に

水層に等容のクロロホルムを添加して振拌した後、12,000 rpm(8,900 g)で室温で10分間遠心分離し、水層を回収した。得られた水層に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、2倍量のエタノールを添加し振拌した後、-30°Cにて3時間保持した。その後、12,000 rpm(8,900 g)で室温で10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収した。これを減圧乾燥した。このDNA全量と前記工程(7)で調製したDNA 1 μgと3単位のT.ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購入)とを、50 mM Tris(HCl)(pH7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオトレイトル(Dithiothreitol)、1 mM スペルミジン(Spermidine)、1 mM ATP、0.1 mg/ml BSA(ペセスダリサーチラボラトリー社、米国より購入)の緩衝液50 μl中で、15°Cにて一塊反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。

(10) G DH産生遺伝子を含有した複合プラスミドpAG1001の取得

前記工程(9)で得られたリガーゼ反応液50 μl

を用いて前記工程(8)-⑩と同じ形質転換操作によりコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物研条寄第558号)の形質転換操作を行なった。

得られたテトラサイクリン耐性形質転換体を、テトラサイクリン10 μg/mlを含むLG寒天培地(L-寒天培地にグルコース5 g/lを添加した培地)上で純化した後、各菌株から前記工程(8)-⑩の方法により、プラスミドを分離し、前記工程(6)の方法によりそれらのプラスミドを解析した。得られたプラスミドをプラスミドpAG1001と命名した。プラスミドpAG1001は、第6図に示した様に、プラスミドpAG50の制限酵素 EcoRI切断部位に、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のG DH産生遺伝子を含む約5.4キロベースのDNA断片が組込まれた複合プラスミドである。

(11) プラスミドpAG1001保有菌株のG DH活性測定

プラスミドpAG1001を保有するコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)

を、テトラサイクリン $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有前記培養液 $50\text{ ml}$ で、 $32^\circ\text{C}$ にて一晩培養した。この培養液より集菌し、 $0.8\%$  NaCl水溶液 $20\text{ ml}$ で2回洗浄後、MES緩衝液( $50\text{ mM}$  2-(モルフオリノ)エタンスルホン酸(以下MESと略す)、 $10\text{ mM}$   $\text{MnSO}_4$ 、 $10\text{ mM}$  EDTA、 $\text{pH}7.0$ ) $1.0\text{ ml}$ に懸濁した。これを、ブラウン社製(西独)のMSKセルホモチナイザー(853021型)で処理した後、 $14000\text{ rpm}$ (20000 $\times g$ )で $4^\circ\text{C}$ で20分間遠心分離して細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。

G D H 活性は、 $3.0\text{ ml}$ の酵素反応液( $100\text{ mM}$  Tris(Tris)-HCl( $\text{pH }8.1$ )、 $5\text{ mM}$   $\alpha$ -ケトグルタル酸、 $10\text{ mM}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $0.15\text{ mM}$  NADPH、 $50\text{ }\mu\text{l}$  細胞抽出液)の $340\text{ nm}$ の吸光度の減少を日立製作所製分光光度計(228型)で測定することにより求めた。また、細胞抽出液の蛋白質濃度の測定には、前記実施例1工程(5)の方法を用いた。結果を第2表に示す。

第 2 表

菌株	G D H 比活性 <sup>1)</sup>
801 <sup>a)</sup>	0.68
801(pAG50)	0.65
801(pAG1001)	3.71

注1) 第1表の注1) と同じ。

注2) コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 801。本菌株は、微生物工業技術研究所に、微工研条寄第558号として寄託されている。

(以下余白)

#### (12) pAG1001の調製

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 801 (pAG1001) より前記工程(8)-(1)の方法に従ってDNA濃度約 $5.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のpAG1001 DNA溶液を $1\text{ ml}$ 得た。

#### (2) 粗換えプラスミドpAG3001の調製

(1) コリネバクテリウム・メラセコラ 801 (*Corynebacterium melassecola* 801) (微工研条寄第558号) のICDH産生遺伝子を有する大腸菌の選択分離のコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*) 801(微工研条寄第558号)からの全DNAの調製とその切断

前記工程(1)-(1)に記載と同様の方法によりDNA濃度 $0.85\text{ mg}/\text{ml}$ の全DNA溶液を得た。

全DNAの切断のためには、 $4.0\text{ }\mu\text{g}$ の全DNAに対して、 $1.60$ 単位の制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社より購入)を加え、 $5.0\text{ mM}$ トリス-HCl( $\text{pH }7.4$ )、 $1.0\text{ mM}$   $\text{MgSO}_4$ 、 $1.00\text{ mM}$   $\text{MnCl}_2$

の緩衝液 $70\text{ }\mu\text{l}$ 中で $37^\circ\text{C}$ にて30分間反応させた。その後 $70^\circ\text{C}$ で10分間加熱して反応を停止させた。

#### ②ベクターpBR325の調製と開裂

先ず、ベクターpBR325をエシェリヒア・コリ K12 EB106(*Escherichia coli* K12 EB106)に移入し、得られた形質転換株からpBR325を開裂した。エシェリヒア・コリ K12 EB106(*Escherichia coli* K12 EB106)を $50\text{ ml}$ のL-ブロス(ポリペプトン $1.0\text{ g}/\text{l}$ 、酵母エキス $5\text{ g}/\text{l}$ 、NaCl $5\text{ g}/\text{l}$  pH7.2)に接種し、 $37^\circ\text{C}$ にて菌濃度 $5 \times 10^8$ 個/ $\text{ml}$ まで増殖させた後、 $2^\circ\text{C}$ で撲滅した。該菌体を $50\text{ ml}$ の氷冷した $1.00\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 水溶液に懸濁し、集菌後更に $2.5\text{ ml}$ の氷冷した $1.00\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ 水溶液に懸濁した。氷中で30分間保持した後、集菌して再度 $5\text{ ml}$ の氷冷した $1.00\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ 水溶液に懸濁し、氷中で1時間保持した(コンピテントセル(Competent cell))。この菌懸濁液 $2.0\text{ ml}$ に $0.1\text{ }\mu\text{g}$ のpBR325 DNAを添加し

て、水中で1時間保持した。その後42℃にて2分間保持した後、5mlのL-プロロスを添加して、37℃にて90分間静置培養した。得られた培養液を適当に希釈して、30μg/mlのアンビシリソを添加したL-寒天培地(L-プロロスに1.5g/mlの寒天を添加した培地)に塗布し37℃で一塊培養した。得られたpBR325による形質転換株より、以下のようにして該ベクターの調製を行った。

ベクター-pBR325を保持したエシエリヒア・コリK12BB106(*Escherichia coli* K12 BB106)を、アンビシリソ(30μg/ml)を含むL-プロロス100mlに植菌し、37℃にて一塊培養した。得られた培養液より集菌しTE緩衝液で洗浄後、1.5%シュークロース、50mMトリス(Tris)-HCl(pH8.5)、50mM EDTA、2mg/mlリゾチウム(シグマ社、米国より購入)よりも水溶液2mlに懸濁し、室温にて30分間反応させた。次にトリトン(Triton)溶液(0.1%トリトン(Triton)X-100, 50mMトリス(Tris)

0.0mM NaClの緩衝液150μl中で37℃にて2時間反応させた。その後、70℃で10分間加熱して、反応を停止させた。この液に酵母ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30℃にて3時間保持した。次に12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した。得られた試料をBAP1緩衝液(50mMトリス-HCl, pH8.4)200μlに溶解し、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ(Bacterial alkaline phosphatase)(宝酒造株式会社より購入)を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収した。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収した。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収した。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収した。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収した。更に該酵素を1単位添加して65℃にて30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で緩和したフェノールを加え、混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう一回同じ操作を繰り

-HCl, 50mM EDTA, pH8.5)2mlを加えて37℃にて30分間保持した。次にこの溶液を、5℃にて30,000rpm(84,000g)で1時間遠心分離し上清を回収し、しTE緩衝液を加えて1.8mlとした。この液に、10mg/mlのエチジウムプロマイド溶液1.2mlと塩化セシウム18.64gとを加えて静かに溶解し、40,000rpm(10,000g)、15℃で48時間遠心分離した。ベクター-pBR325は、紫外線照射により遠心チューブ中、2本のバンドの下方として見い出され、このバンドを遠心チューブの側面から注射器で抜き取ることにより、ベクター-pBR325を分離した。次にこの分離液を等容量のイソプロピルアルコールで4回抽出して、エチジウムプロマイドを除去し、その後にTE緩衝液に対して透析して、DNA濃度180μg/mlのベクター-pBR325の透析完了液1mlを得た。

ベクター-pBR325 DNA 15μgに対して45単位の制限酵素EcoRIを加えて、50mMトリス(Tris)-HCl(pH7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、1

mlし、水層を回収した。更に水層に等容のクロロホルムを添加して掻拌した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離し、水層を回収した。該水層に酵母ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加し掻拌した後、-30℃にて3時間保持した。その後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収した。これを減圧乾燥した後、30μlのTE緩衝液で溶解した。

#### ④DNAの粗換え反応

前記工程(2)-(1)-①のDNA 4μgと前記工程(2)-(1)-②のDNA 2μgと3単位のT.ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購入)とを、50mMトリス(Tris)-HCl(pH7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、1mMジオトレイタル(Dithiothreitol)、1mMスペルミジン(Spermidine)、1mM ATP、0.1mg/mlウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin、以下BSAと称す)（ベゼスダリサーチラボラトリー社、米国より購入）の緩衝液100μl中で、15℃にて

一晩反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。

#### ④組換えプラスミドの大腸菌への移入

前記工程(2)-(1)-③の方油により、エシエリヒア・コリ K 1 2 EB 1 0 6 (*Escherichia coli* K 1 2 EB 1 0 6)のコンピテントセル(Competent cell)を調製した。得られた細胞懸濁液400μlと前記工程(2)-(1)-③の反応液40μlとを混合して、氷中に1時間保持した。その後、42°Cにて2分間加熱した後、5mlのL-ブロスを添加して37°Cにて90分間静置培養した。次に、得られた培養液から集菌し、無菌水に懸濁した。得られた懸濁液を、合成寒天培地(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/l、NaCl 0.5g/l、NH<sub>4</sub>Cl 1g/l、MgSO<sub>4</sub> 1mM、CaCl<sub>2</sub> 0.1mM、グルコース 2g/l、寒天 1.5g/l、L-トリプトファン0.1mM)を並布して培養した。このようにして得られた菌株を、クロラムフェニコール(20μg/ml)とテトラサイクリン(10μg/ml)とを含む前記合成寒天培地と、テトラサイクリン(10

μg/ml)のみを含む前記合成寒天培地とでそれれ培養し、生育の有無を調べた。その結果、クロラムフェニコール感受性テトラサイクリン耐性グルタミン酸非要求性を示す菌株を、目的のICDH産生遺伝子を保有した大腸菌エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG302)として分離した。

該大腸菌のICDH活性を、下記の方法で測定することにより、クローニングした遺伝子がICDH産生遺伝子であることを確認した。前記L-ブロス50mlで、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 (pAG302)を32°Cで振盪培養した。該大腸菌を集菌後、2mlのMES緩衝液(50mM 2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸[2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid]:MES, 10mM MnSO<sub>4</sub>, 10mM EDTA, pH 7.0)に懸濁した。これを超音波処理した後、14000rpm(20000g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。尚、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pBR325)、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG302)を培養する場合には、前記L-ブロスにテトラサイクリン10μg/mlを添加した。エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG303)を培養する場合には、前記L-ブロスにアンビシリン30μg/mlを添加した。エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG311)を培養する場合には、前記L-ブロスにクロラムフェニール20μg/mlを添加した。また、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 やエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pBR325)を培養する場合には、前記L-ブロスに、グルタミン酸ナトリウム(MSOと略す)2g/lを添加した。

ICDH活性は、2.9mlの酵素反応液(103mMトリス(Tris)-HCl (pH 7.4) 1mMイソクエン酸塩(Isoocitrate), 1mM MnCl<sub>2</sub>, 0.6mM酸化型ニコチニアミドアデニジスクレオチドリリン酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Oxidized Form, 以下NADPと略す)、40μl細胞抽出液)の340nmの吸光度の増大を、日立分光光度計(228型)で測定するとにより求めた。また、細胞抽出液の蛋白質濃度の測定には、ローリー(Lovry)ら(オー・エイチ・ローリー(O.H.Lovry)、エヌ・ジェイ・ローウェブロー(N.J.Robebrough)、アール・ジェイ・ランダル(R.J.Randall)、ジェイ・バイオル・ケム(J.Biol.Chem.) 193巻、265頁1951年)の方油を用いた。尚、同測定の標準蛋白質として、ウシ血清アルブミン(和光純業工業社より購入)を用いた。

測定結果を第3表に示す。第3表のICDH活性測定結果より、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG302)は、明らかにICDH活性を回復していた。

(2) 組合プラスミドpAG302の分離と解析  
エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K 1 2 EB 1 0 6 (pAG302)より、前記工程

(1) - (2) の方法でプラスミド pAG302 の DNA を、 $180 \mu\text{g}$  分離・製した。この DNA 0.3  $\mu\text{g}$  に、各 10 単位の制限酵素 (EcoRI, BamHI (ニッポンジーン社より購入)、HindIII (ニッポンジーン社より購入)、PstI (ベゼスダリサーチラボトリー社、米国より購入)、SalI (ニッポンジーン社より購入)、XbaI (ニッポンジーン社より購入) ) を、それぞれの適正条件にて反応させ、その消化した試料を前述の方法に従い 1% アガロースゲル電気泳動、および 4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動の終ったゲルを  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  エチジウムプロマイド水溶液に浸漬して 30 分間染色した後、紫外線をゲルに照射して生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から各々の分子量を算出した。尚、分子量は、同一アガロースゲル上で同時に電気泳動したラムダファージ ( $\lambda$  phage) DNA (ニッポンジーン社より購入) の制限酵素 HindIII による消化断片の既知分子量に、または同一ポリアクリルアミドゲル上で同時に電気泳動したファイエックス 174 ファージ ( $\phi X$

受性グルタミン酸非要求性であった。更に、該形質転換株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制限酵素切断模式で同一と判定されるプラスミドであった。

### (3) ICDH 生産遺伝子を含む約 5.1 キロベースの DNA 断片の縮小化

前記工程 (2) で調製したプラスミド pAG302 DNA  $3 \mu\text{g}$  に対して 20 単位の制限酵素 SmaI を加えて、 $50 \text{mM}$  Tris-HCl (pH 7.4)、 $10 \text{mM}$  MgSO<sub>4</sub>、 $10 \text{mM}$  NaCl の緩衝液  $50 \mu\text{l}$  中で 37℃ にて 2 時間反応させた。そこへ等容のフェノール・クロロホルム (1 : 1, v/v) 液を添加して振搾の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して振搾の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度  $300 \text{mM}$  になるように加え、次に 2 倍容のエタノールを添加して、-30℃ で 3 時間保持した後、 $12,000 \text{rps}$  ( $8,900 \text{g}$ ) で 10 分間遠心分離して DNA の沈殿を回収し、これを減圧乾

燥 (phage) DNA の制限酵素 HaeIII による消化断片 (ベゼスダリサーチラボトリー社より購入) の既知分子量に、基づいて算出した。更に、複数の制限酵素処理によって生じた消化断片を解析することにより、プラスミド分子中の各制限酵素切断部位を決定した。このようにして得られたプラスミド pAG302 の制限酵素切断地図を第 7 図に示す。

その結果、プラスミド pAG302 は、ベクターの pBR325 の制限酵素の切断部位に約 5.1 kb の ICDH 遺伝子を含む外来の EcoRI 断片が、組み込まれていた。この EcoRI 断片がコリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 (株工研系寄第 558 号) 由来の ICDH 産生遺伝子を含む断片である。

プラスミド pAG302 DNA により、前記工程 (1) - (2) の方法でエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12 EB106 を形質転換した。その結果、調べた形質転換株は、全てテトラサイクリン耐性アンビシリン耐性クロラムフェニコール感

情した (DNA 試料 I)。

前記の DNA 試料 I の全量に対して、3 単位の T4 ファージ DNA リガーゼを  $50 \text{mM}$  Tris (Tris)-HCl (pH 7.4)、 $10 \text{mM}$  MgCl<sub>2</sub>、 $10 \text{mM}$  ジオトレイトル (Dithiothreitol)、 $1 \text{mM}$  スペルミジン (Spermidine)、 $1 \text{mM}$  ATP、 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$  BSA の緩衝液  $50 \mu\text{l}$  中で、15℃ にて一晩反応させた。その後、70℃ にて 10 分間加熱することにより、反応を停止させた。

このリガーゼ反応液を用いて、前記工程 (2) - (1) の方法により、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12 EB106 の形質転換操作を行った。その結果、アンビシリン耐性クロラムフェニコール感受性テトラサイクリン感受性グルタミン酸非要求性を示す形質転換株を多数分離することができた。これらの菌株について、前記工程 (2) の方法により、各形質転換株の保有するプラスミドを分離し解析した結果、プラスミド pAG303 を取得することができた。得られ

たプラスミドpAG303の制限酵素切断地図を第8図に示す。

プラスミドpAG303を保有する菌株エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12 EB106 (pAG303)について、前記工程(1)の方法により、ICDH活性を測定した。但し、この場合には前記Lープロスにアンピシリン30 μg/mlを添加した。その結果、第3表に示すように、ICDH活性の明らかな回復が認められた。プラスミドpAG303はベクターpBR325由来のEcoRI-SalI断片に約3.4キロベースの外来のEcoRI-SalI断片が組込まれていた。このEcoRI-SalI断片が、コリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 (微生物研究会第558号) 由来のICDH生産遺伝子を含むDNA断片である。

プラスミドpAG303 DNAにより、前記工程(2)-(1)の方法で、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12 EB106を形質転換した。得られた形質転換株を調べた結果、開

いた形質転換株は、全てクロラムフェニコール感受性アンピシリン耐性テトラサイクリン感受性グルタミン酸非要求性であった。更にそれら形質転換株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制限酵素切断模式で同一と判定されるプラスミドであった。

(以下余白)

(4) ICDH生産遺伝子を含む約3.4キロベースのEcoRI-SalI断片におけるEcoRI末端SalI末端への変更

前記工程(2)で調製したプラスミドpAG302 DNA 5 μgに対して20単位の制限酵素EcoRIを加えて50 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液100 μlで37°Cにて、2時間反応させた。その後、70°Cで10分間加熱して、反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保持した。次に12,000 rpm (8,800 g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した (DNA試料II)。

DNA試料IIと3単位T,DNAポリメラーゼ (T,DNA polymerase) (宝酒造株式会社より購入)とを、33 mM Tris (Tris)-CH<sub>3</sub>COOH (pH 7.9)、66 mM CH<sub>3</sub>COOK、10 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg、0.5 mMジオトトレ

イトル(Dithiothreitol)、0.1 mg/ml BSA、0.1 mM 2'-デオキシアデノシン5'トリホスフェート (シグマ社、米国より購入)、0.1 mM 2'-デオキシシチジン5'トリホスフェート (シグマ社、米国より購入)、0.1 mM 2'-デオキシグアノシン5'トリホスフェート (シグマ社、米国より購入)、0.1 mM チミジン5'トリホスフェート (シグマ社、米国より購入)の反応液44 μl中で30°Cにて20分間反応させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保持した。次に12,000 rpm (8,800 g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した (DNA試料III)。

SalIリンク (SalI linker) (宝酒造株式会社より購入) 1.5 μgとT,DNAポリメラーゼ (T,DNA polymerase) (宝酒造株式会社より購入) 2.5 単位とを、66 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.6)、1 mM

ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン (Spermidine)、15 mM ジチオトレイトル (Dithiothreitol)、0.2 mg/ml BSA の反応液 10 μl 中で 37°C にて 1 時間反応させた (DNA 試料 IV)。

DNA 試料 III の 1/2 量と DNA 試料 IV 全量と T. ファージ DNA リガーゼ (T. phage DNA ligase) 8 単位とを、66 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.6)、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン (Spermidine)、15 mM ジチオトレイトル (Dithiothreitol)、0.2 mg/ml BSA の反応液 22 μl 中で 22°C にて 4 時間反応させた。この反応液に等容のフェノール・クロロホルム (1:1 v/v) 液を添加して振拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して振拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度 300 mM になる様に加え、次に 2 倍容のエタノールを添加して、-30°C で 3 時間保持した後、12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離して DNA 沈殿を

回収し、これを減圧乾燥した (DNA 試料 V)。

DNA 試料 V 全量に対して、15 単位の制限酵素 Sma I を加えて、50 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaCl の緩衝液 50 μl 中で 37°C にて、2 時間反応させた。消化した試料は、前記の方法により、1% アガロースゲル電気泳動に供した。ただし、電気泳動には、ベゼスダリサーチラボトリー社より購入した LMP アガロース (Agarose) を使用し、4°C で電気泳動した。次にエチジウムプロマイドで染色したアガロースゲルを紫外線照射下に置き、約 3.4 キロベースの DNA 断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。切り出したアガロースゲルにその重量の 3 倍量の TE 緩衝液を加えて、65°C で 10 分間加熱し、アガロースゲルを完全にとかした。次に等容のフェノールを添加して振拌の後、水層を回収した。得られた水層に等容のフェノール・クロロホルム (1:1 v/v) 液を添加して振拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加

して振拌の後、水層を回収した。得られた水層に酢酸ナトリウムを最終濃度 300 mM になる様に添加し、更に 2 倍容のエタノールを加えて振拌の後、-30°C で 3 時間保持した。その後、10,000 rpm (9,000 g) で 10 分間遠心分離して DNA 沈殿を回収した。次に、得られた沈殿を減圧乾燥した (DNA 試料 VI)。

前記工程 [1] - [2] で調整したプラスミド pBR3.2.5 の DNA 4 μg に対して、20 単位の制限酵素 Sma I を加えて、50 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaCl の緩衝液 50 μl 中で 37°C で 2 時間反応させた。そこへ等容のフェノール・クロロホルム (1:1 v/v) 液を添加して振拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して振拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度 300 mM になる様に加え、次に 2 倍容のエタノールを添加して、-30°C で 3 時間保持した後、12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離して DNA の沈殿

を回収し、これを減圧乾燥した (DNA 試料 VII)。

DNA 試料 VI 全量と DNA 試料 VII 全量と 3 単位の T. ファージ DNA リガーゼとを、50 mM Tris (Tris)-HCl (pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオトレイトル (Dithiothreitol)、1 mM スペルミジン (Spermidine)、1 mM ATP、0.1 mg/ml BSA の緩衝液 100 μl 中で、15°C にて一塊反応させた。その後 70°C にて 10 分間加熱することにより、反応を停止させた。このリガーゼ反応液 40 μl を用いて、前記工程 [2] - [1] の操作を行った。その結果、得られた菌株を、テトラサイクリン (10 μg/ml) とクロラムフェニコール (20 μg/ml) とを含む前記合成寒天培地と、クロラムフェニコール (20 μg/ml) のみを含む前記合成寒天培地とでそれぞれ培養し、生育の有無を調べた。その結果、グルタミン酸非要求性で、テトラサイクリン感受性クロラムフェニコール耐性を示す菌株を分離した。次に、これらの菌株から前記工程 [1] - [2] の方法により、それぞれの菌株の保有す

るプラスミドを単離精製した。これらのプラスミドDNAを用いて、前記工程〔2〕-(2)の方針により、各プラスミドの構造を調べた結果、目的の複合プラスミドpAG311を取得した。プラスミドpAG311は、プラスミドpBR325の制限酵素Sa I 切断部位に、約3.4キロベースのICDH産生遺伝子を含む外來のSa I 断片が組込まれていた。得られたプラスミドpAG311の制限酵素切断地図を第9図に示す。このSa I 断片が、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melasseco* la)801(微工研発第568号)由来のICDH 産生遺伝子を含む約3.4キロベースのEcoRI-Sa I 断片のEcoRI末端をSa I 末端に変更したDNA断片である。

プラスミドpAG311を保有する菌株エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 EB106(pAG311)について、前記工程〔2〕-(1)の方法により、ICDH活性を測定した。但し、この場合には前記L-プロスにクロラムフェニコール20 μg/mlを添加した。その結果、第3表に示すよう

に、ICDH活性の明らかな回復が認められた。プラスミドpAG311 DNAにより、前記工程〔2〕-(1)の方法で、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 EB106を形質転換した。その結果、調べた形質転換株は、全てテトラサイクリン感受性クロラムフェニコール耐性アンビシリン耐性グルタミン酸非要求性であった。更に該形質転換株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制限酵素切断様式で同一と判定されるプラスミドであった。

第3表

菌 株	ICDH比活性 <sup>2)</sup>
EB106 <sup>3)</sup>	0.00
EB106(pBR325)	0.01
EB106(pAG302)	4.07
EB106(pAG303)	2.38
EB106(pAG311)	0.21

注1) 反応液中の蛋白質1mgが、1分間に生成

させたNADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form) のマイクロモル数で表示してある。

注2) イー・コリ ジェネティック ストックセンター (E. coli Genetic Stock Center)、デパートメント オブ ヒューマン ジェネティックス、エール ユニバーシティ、スクール オブ メディシン、333 シーダーストリート、ビー・オーピックス 3333、ニューヘイブン、コネチカット 06510、アメリカ合衆国(Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street P. O. Box 3333, New Haven, Connecticut 06510 U. S. A)のバーバラ ジェイ バックマン(Barbara J. Bachmann)より分譲されたエシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12の変異株である。本菌株は、ICDH活性を欠損している。尚、上記標図からは、膚でも該菌株の分譲を受けることができる。

(5) プラスミドpAG311からのICDH産生遺伝子を含む約3.4キロベースの

#### Sa I 断片の分離

前記工程〔2〕-(4)で調製したプラスミドpAG311のDNA 20 μgに対して、制限酵素Sa I を60単位加えて、5.0 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.0 mM MgSO<sub>4</sub>、1.00 mM NaClの緩衝液1.00 ml中で、37℃にて2時間反応させた。消化した試料は、前記工程〔1〕-(7)の方法によりアガロースゲル電気泳動に供した。次にICDH産生遺伝子を含む約3.4キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。切り出したアガロースゲルからのDNAの抽出は、前記工程〔1〕-(7)の方法を用いた。その結果、グルタミン酸生産性コリニ型細菌由来のICDH産生遺伝子を含む約3.4キロベースのEcoRI-Sa I 断片の制限酵素EcoRI処理によって生じる末端を制限酵素Sa I 処理によって生じる末端に変更した断片を約4 μg取得した。

(6) プラスミドpAG50へのICDH産生遺伝子を含むDNA断片の組込み。

前記工程 (1) - (8) - ④で調製したプラスミドpAG50のDNA 5 μgに対して、制限酵素 *Sac* I を 1.5 単位加えて、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaCl の緩衝液 50 μl 中で、37°Cにて 2 時間反応させた。その後、70°Cで 10 分間加熱して、反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度 300 mM になる様に加え、2 倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて 3 時間保持した。次に 12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離して DNA 沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した。得られた試料を BAP T 緩衝液 (50 mM トリス (Tris) - HCl, pH 8.4) 200 μl に溶解し、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ (Bacterial alkaline phosphatase) (宝酒造株式会社より購入) を 1 単位添加して 65°Cにて 30 分間反応させた。更に該酵素を 1 単位添加して 65°Cで 30 分間反応させた。その後、反応液に等容の TNE 緩衝液で希釈したフェノールを加え、混合した後、12,000 rpm

BSA (ベゼダリサーチラボラトリー社より購入) の緩衝液 50 μl 中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、70°Cにて 10 分間加熱することにより、反応を停止させた。

(以下余白)

(8,900 g) で 10 分間遠心分離して水層を回収し、更にもう 1 回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム (1 : 1, v/v) 液を添加して混合した後、12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離し、水層を回収した。更に水層に等容のクロロホルムを添加して攪拌した後、12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離し、水層を回収した。該水層に酢酸ナトリウムを最終濃度 300 mM になる様に加え、2 倍容のエタノールを添加し攪拌した後、-30°Cにて 3 時間保持した。その後、12,000 rpm (8,900 g) で 10 分間遠心分離し、DNA 沈殿を回収した。これを減圧乾燥した。このDNA 全量と前記工程 (2) - (5) で調製したDNA 1 μg と 3 単位の T. ファージ DNA リガーゼ (ニッポンジン社より購入) とを 50 mM トリス (Tris)-HCl (pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ディオトリアイトール (Dithiothreitol)、1 mM スペルミジン (Spermidine)、1 mM ATP、0.1 mg/ml

#### (7) ICDH 產生遺伝子を含有した複合プラスミドpAG3001の取得

前記工程 (2) - (6) で得られたリガーゼ反応液 50 μl を用いて前記工程 (1) - (8) - ④ と同じ形質転換操作によりコリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 (微生物研究会第 558 号) の形質転換操作を行なった。

得られたテトラサイクリン耐性形質転換株を、テトラサイクリン 10 μg/ml を含む L-G 寒天培地 (L-G 寒天培地にグルコース 5 g/ml を添加した培地) 上で純化した後、各菌株から前記工程 (2) - (6) の方法により、プラスミドを分離し、前記工程 (1) - (6) の方法によりそれらのプラスミドを解析した。その結果、プラスミド pAG3001 を取得した。プラスミド pAG3001 は第 10 回に示した様に、プラスミド pAG50 の制限酵素 *Sac* I 切断部位に、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来 ICDH 產生遺伝子を含む約 3.4 キロベースの DNA 断片が組込まれた複合プラスミドであ

る。

(8) プラスミドpAG3001保有菌株のICDH活性の測定

プラスミドpAG3001保有のコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAG3001)をテトラサイクリン $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有LGリン酸培地(L-プロスに、グルコース $2\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 0.7\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.3\text{g}/\text{l}$ を加えてpH 7.2に調整した培地)50mlで、32°Cにて一晩振盪培養した。この培養液より集菌し、0.8% NaCl水溶液20mlで2回洗浄後、MES緩衝液10mlに懸濁した。これを、ブラウン社製のMSKセルホモジナイザー(853021型)で処理した後、14000rpm(20000g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。この細胞抽出液を用いたICDH活性の測定は、前記工程[2]-(1)の方法により行った。その結果、第4表に示した様に、プラスミドpAG3001保持菌株は、ベクターpAG50保持菌株やプラスミド非保持菌株

に比べて、高いICDH比活性を示した。尚、プラスミド非保持菌株の培養はテトラサイクリン無添加で行った。

第4表

菌株	ICDH比活性 <sup>a)</sup>
801 <sup>b)</sup>	0.51
801(pAG50)	0.59
801(pAG3001)	3.59

注1) 第3表の注1)と同じ

注2) 第2表の注2)と同じ

(9) pAG3001の調製

*Corynebacterium melassecola* 801(pAG3001)を培養培地1.00mlで培養し、前記工程(1)-(10)と同様の方法で処理することによりpAG3001 DNA溶液(約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $1.2\text{ml}$ を得た。

(3) GDH遺伝子とICDH遺伝子を含む組換えプラスミドの作製

(1) GDH遺伝子を含むDNA断片の調製  
前記工程(1)で得られたpAG1001 DNA( $2\mu\text{g}$ )を $100\mu\text{g}$ の $50\text{mM Tris-HCl}$ (pH7.5)、 $100\text{mM NaCl}$ 、 $10\text{mM MgSO}_4$ の緩衝液中で、10単位のSai Iにより37°Cで2時間反応させることにより切断した。本DNA溶液に等容のフェノール/クロロホルム液を加えて搅拌、遠心分離(12,000rpm(8,900g)、5分)後、水層を回収し、さらに等容のクロロホルムを加えて上記操作を繰り返した。水層に1/10容の酢酸ナトリウム(3M)と2.5倍容のエタノールとを添加混合後-80°Cで30分間静置し、遠心分離(12,000rpm(8,900g)、10分間)により沈殿を分離した。これに70%エタノール水溶液を少量加えて遠心洗浄後、沈殿を減圧乾燥させてpAG1001 DNAのSai I分解物を得た(DNA試料A)。

(2) ICDH遺伝子を含むDNA断片の調製

前記工程(2)で得られたpAG3001 DNA溶液 $200\mu\text{g}$ ( $100\mu\text{g}$  DNA)を $50\text{mM Tris-HCl}$ (pH7.5)、 $100\text{mM NaCl}$ 、 $10\text{mM MgSO}_4$ の緩衝液 $400\mu\text{l}$ 中でSai I(20単位)で切断した。反応は37°Cで2時間行っ

た。反応液を70°Cで10分間加熱して制限酵素を失活させた後、アガロースゲル電気泳動によりICDH遺伝子を含むDNA断片(ICDH断片)を分離した。すなわち、1%アガロースゲル(米国ベセスダ・リサ-チ・ラボラトリー社(BRLと略す)製のLMP-Aガロースを使用)を用いて、80Vの定電圧、4°Cで4時間電気泳動を行った後、エチジウムプロマイド水溶液( $1\text{mg}/\text{l}$ )に30分間浸して染色し、紫外線(UV)の照射下に約3.4kbのDNAバンドの存在を確認した。本バンドの部分のゲルを切出してゲルの重量の3倍のTE緩衝液を加えて65°Cで10分間加熱を行い、ゲルを完全に溶解させた。これに等容のフェノール液を加えて搅拌した後、20°Cで10,000rpm(9,000g)、10分間の遠心分離を行って、水層を回収した。さらに同様にフェノール/クロロホルム抽出、およびクロロホルム抽出を行った。尚、フェノール液、フェノール/クロロホルム液及びクロロホルム液の調製はマニアティス等の文献(T. Maniatis, E.P. Fritsch, J. Sambrook, (1982) Molecular Cloning:A Laboratory

Manual, pp.458-459, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)に従つた。水層に1/10容の3M酢酸ナトリウムと2.5倍容のエタノールとを添加混和の後、-80°Cで30分間静置し、その後4°Cで10,000rps(9,000g)、10分間の遠心分離を行つて、沈殿を回収した。沈殿に少量の70%エタノール水溶液を静かに加えて洗浄した後、減圧乾燥してICDH断片を約2μg得た(DNA試料II)。

## (3)組換えプラスミドの作製

DNA試料IVおよびDNA試料IIの全量をそれぞれ少量の蒸留水で溶解後混合し、これを50mM Tris-HCl(pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジオヌレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP、0.1mg/ml BSA(BRL社製)の緩衝液50μl中でリガーゼ反応を行つた。反応は1単位のT<sub>4</sub>ファージリガーゼを加えて37°Cで1時間行つた。反応終了後、本反応液を70°Cで10分間加熱処理を行いリガーゼを失活させた。さらに上記と同様に酢酸ナトリウムとエタノールを加えて遠心分離によりDNAの沈殿を得、

もの)5mlにそれぞれ植菌して32°Cで1晩培養した。各培養液から常法に従いプラスミドDNAを分離した(アルカリ溶離法:T.Maniatis, E.P. Fritsch, J.Sambrook,(1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp368-369, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York参照、但しリゾチーム濃度20mg/ml、リゾチーム処理条件を42°C1時間に変更した)。各DNAをSal Iで切断後アガロースゲル電気泳動を行い、Sal I処理で約13kbと約3.4kbの2本の断片が生じるものを目的のプラスミドとし、そのようなプラスミドを含む菌株を2株分離した。

上記2株のうちの1株、Corynebacterium melassecola 801(pIG101)より、前記工程(1)-(8)-①の方法に従つて新規組換えプラスミドpIG101のDNA溶液(40μg/ml)を1.5ml取得した。本プラスミドにつき、常法に従つて制限酵素による切断点地図を決定した。結果を第11図に示す。その結果pIG101はpAG1001のSal I切断点に3.4kbのICDH断片が組込まれた組換えプラスミドであることが判

これも50μlのTE緩衝液に再溶解させて次の形質転換の操作に使用した(DNA試料X)。

〔4〕Corynebacterium melassecola 801の形質転換

前記DNA試料Xを用いて前記実施例1-(8)-④と同じ操作によりコリネバクテリウム・メラセコラ(Corynebacterium melassecola)801(微生物研究系寄第558号)の形質転換を行なつた。出現したテトラサイクリン耐性コロニーをテトラサイクリン10μg/mlを含むLG寒天培地(LG培地に寒天15g/lを含む培地:LG培地とはペプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 2.5g、グルコース2gを純水1lに溶かしpH 7.2に調整したもの)上で純化した後4°Cで保存した。

## 〔5〕組換えプラスミドの確認

上記形質転換株の中から目的の組換えプラスミドを保持した菌株を選択するために、プラスミドの解析を行つた。上記形質転換株20株をテトラサイクリン10μg/mlを含むLGP培地(LG培地にK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7g/lとKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3gとを添加した

明した。

## 〔6〕GDHおよびICDH活性の測定

前記培養液50mlにCorynebacterium melassecola 801(pIG101)を植菌し、32°Cで1晩培養した。遠心分離により菌体を集め、0.85(V/V)NaCl水溶液20mlで2回洗浄後、MES緩衝液[50mM Z-(N-morpholino)ethanesulfonic acid: MES, 10mM MnSO<sub>4</sub>, 10mM EDTA]12mlに懸濁した。これをブルン社(西独)製のMSKセルホモジナイザー(853012型)で処理した後、14,000rps(20,000g)で20分間遠心分離して細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。同様に比較対照としてプラスミドを保持しないCorynebacterium melassecola 801からも粗酵素液を得た。但し、この場合の菌の培養はテトラサイクリンを含まない培養培地で行った。各粗酵素液を用いてこれらのGDHおよびICDHの活性を以下の様にして測定した。GDH活性は2.5mlの酵素反応液(50mM Tris-HCl(pH 7.6), 20mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25mM KADPH, 5mM α-ケトグルタル酸, 10-100μg/mlの細胞抽出液)の30°Cにおける340nmの吸

光度の減少を日立分光光度計(228型)で測定することで求めた。またICDH活性は2.9μMの酵素反応液(50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mMイソクエン酸塩、1mM MnCl<sub>2</sub>、0.5mM NADP<sup>+</sup>、10~100μgの細胞抽出液)の30℃における340nmにおける吸光度の増大を測定することで求めた。細胞抽出液のタンパク質濃度はローリーら(O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, R.J.Randall, (1951), J.Biol.Chem., 193, 265)の方針に従い、ウシ血清アルブミン(和光純薬工業社製)を標準タンパク質として測定した。GDHおよびICDHの測定結果を第5表に示したが、この結果からCorynebacterium melassecola 801(pIG101)は明らかにGDHとICDHとが同時に強化されていることが確認された。

注2) 第1表の注1)と同じ。

注3) 第2表の注2)と同じ。

(以下余白)

第5表

菌株	ICDH <sup>(1)</sup>	GDH <sup>(2)</sup>
801 <sup>(3)</sup>	0.82	0.85
801 (pIG101)	4.5	4.2

注1) 第3表の注1)と同じ。

## 実施例2

本実施例ではAH+ICDH+GDHの3重強化体を作成した例を示す。

AH遺伝子を含む組換えプラスミドとしてはpAG5001を使用した。pAG5001はコリネバクテリウム・メラセコラ(Corynebacterium melassecola)801由来のAH遺伝子を含む約4.7kbのXba I断片がベクタープラスミドpAG50のXba I切断点に組込まれたものであり、本プラスミドの作製方法は特開昭61-136083に詳細に記述されている。

ICDH遺伝子とGDH遺伝子を同時に保持するプラスミドとして、前記実施例1-[5]に記載したpIG101を使用した。

(1) pAG5001からのAH遺伝子を含むDNA断片の調製

(1) AHを欠損し、かつ制限能を欠損した宿主菌の育種

① AH欠損株からの染色体DNAの調製

バチルス・ズブテリス(Bacillus subtilis)

168 50371(米国エヌ・アイ・エイチのイー・フリー

ス博士(Dr.E.Freese, NIH, USA)より分譲をうけた。をL-プロス(ボリペプトン10g/l、酵母エキス5g/l、NaCl 10g/l、pH 7.2)100mlに植菌し、37℃にて一昼夜とう培養した。同培養液より菌体を集め、洗浄した後、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTAの緩衝液5mlに懸濁した。これにリゾチウムを最終濃度5mg/mlになるように加え、37℃にて1時間反応させた。これにプロナーゼB(シグマ社より購入)を最終濃度200μg/mlになるよう加え、室温で15分間反応させた。その後、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度1%になるよう添加して37℃にて1時間反応させた。反応終了後、反応液と等容のTNE緩衝液(50mM Tris-HCl、5mM EDTA、100mM NaCl、pH 8.0)で希釈したフェノールを加え混合した後、10,000rpm(11,000g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層にフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を等容加えて混合の後、10,000rpm(11,000g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層に更に等容のクロロホルムを加えて混合の後、10,000rpm

(11,000g)で10分間遠心分離して水層を回収した。この水層にリボヌクレアーゼA(シグマ社より購入)を最終濃度40μg/mlになる様に加えて37℃にて1時間反応させた。反応終了後、1/5容の5M NaCl水溶液と1/4容の50%ポリエチレンギリコール6,000水溶液を添加混合し、4℃にて4時間保持した。得られた試料を5,000rpm(2,700g)で20分間遠心分離し、沈殿を回収した。沈殿をTE緩衝液(10mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH 7.5)4mlに培養し、酵酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加えて、2倍容のエタノールを添加した。同試料を振拌の後、-30℃にて3時間保持し、10,000rpm(11,000g)で20分間遠心分離し、沈殿を回収した。同沈殿を減圧乾燥の後、TE緩衝液5mlに溶解し、DNA濃度0.35mg/mlの全DNA溶液を得た。(DNA試料Ⅲ)

#### ② 制限酵素粗株の形質転換

バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168  
M1113(アルギニン要求かつトリプトファン要求かつ制限酵素粗株)(大阪大学工学部、合葉修一教

授より分譲をうけた。〔今中ら、ジャーナル オブ バクテリオロジー、第146巻、1091-1097頁、1981年(Imanaka et al., J.Bacteriol., 146, 1091-1097, (1981))〕をL-プロス5mlに植菌し、37℃にて1晩培養した。その培養液2mlを14g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/l 硫酸アンモニウム、1g/l クエン酸ナトリウム、5g/l グルコース、0.2g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.2g/l カザミノ酸(ディフコ社製)、50mg/l L-アルギニン、50mg/l L-トリプトファンを含む培地40mlに移植し、37℃で4時間振とう培養後、その培養液4mlを14g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/l 硫酸アンモニウム、1g/l クエン酸ナトリウム、5g/l グルコース、0.2g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1g/l カザミノ酸、5mg/l L-アルギニン、5mg/l L-トリプトファンを含む培地35mlに移植してさらに37℃で90分間振とう培養した。本培養液1mlに、前記工程で得られたDNA試料Ⅲ 100μgを加えて37℃で30分間はげしく振とう培養後、50mg/l のL-トリプトファンと1g/l のL-グルタミン酸ナトリウムとを含む

スピッティゼンの最少寒天培地(14g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2g/l 硫酸アンモニウム、1g/l クエン酸ナトリウム、5g/l グルコース、0.2g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、15g/l 寒天(ディフコ社製)、(ジェイ・スピッティゼン、プロシードィングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ: 第44号、1072-1078頁、1958年(J.Spezizen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 44, 1072-1078(1958)))上に植布し、37℃で2日間培養した。生じたアルギニン非要求性コロニーを、50mg/l のL-トリプトファンと1g/l のL-グルタミン酸ナトリウムを含むスピッティゼンの最少寒天培地(A)と50g/l のL-トリプトファンのみを含むスピッティゼンの最少寒天培地(B)とにつまようじで移植し、(A)上で増殖して(B)上で増殖できないコロニーをAH欠損かつ制限酵素粗株として単離し、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3株と名づけた。尚、該菌株は、微生物工芸技術研究所に微研系寄第1042号として寄託されている。

(2) コリネバクテリウム・メラセコラ 801(*Corynebacterium melassecola*)(微研系寄第558号)からの全DNAの調製とその切断

コリネバクテリウム・メラセコラ 801(*Corynebacterium melassecola* 801)(微研系寄第558号)から前記実施例1工程〔1〕-(1)と同様の方法によりDNA濃度0.85mg/mlの全DNA溶液2mlを得た。全DNAの切断のためには、128μgの全DNAに対して13単位の制限酵素 Xba I (TOYOBO社より購入)を加え、50mMトリス-HCl(pH7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaClの緩衝液200μl中で37℃にて2時間反応させた。その後70℃で10分間加熱して反応を停止させた。(DNA試料Ⅲ)

#### (3) プラスミドpUB110の調製

先づ、プラスミドpUB110をバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*) 168 MA3に移入し、得られた形質転換株からpUB110を調製した。即ち、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*) 168MA3(微研系寄第1042号)を50mlのL-プロスに植菌し、日立228型分光光度計で波長880nmにおける吸

光度が0.5となるまで増殖させた後、集菌した。該菌体を5mLのSMH緩衝液(0.5M シュークロース、0.02M マレイン酸、0.02M MgCl<sub>2</sub>、pH 6.5)で洗浄後、5mLのSMH緩衝液に再懸濁した。この菌懸濁液4.5mLに10μg/mL濃度のリゾチームを含有するSMH緩衝液(ミリポアフィルターで臓留した)0.5mLを添加して、42℃で1時間静置反応させた。プロトプラスト化した細胞を7,000rpm(4,500g)、5℃、7分間の遠心分離で回収し、SMH緩衝液5mLに懸濁した。同様の操作を更にもう一度行った後、SMH緩衝液5mLに再懸濁してプロトプラスト菌液とした。

プラスミドpUB110(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーアより購入)をTE緩衝液(10mMトリス-HCl(pH 7.0)、1mM EDTA)に100μg/mLの濃度となるように溶解し、このDNA溶液50μLと2倍濃度のSMH緩衝液50μLとの混合液を上記プロトプラスト菌液0.5mLに添加した。その後更にPEG液(SMH緩衝液にポリエチレングリコール6000(Polyethylene glycol 6000)を40%濃度に溶解する)1.5mLを

添加してゆるやかに混合し、2分間室温で静置した。その後SMH-PVP培地(L-プロスと2倍濃度のSMH緩衝液を等量混合し、更にポリビニルピロリドン(PVP:Polyvinyl pyrrolidone)を終濃度40g/Lとなるように添加したもの)を5mL添加して、4,000 rpm(1,800g)で10分間遠心分離して、上澄液を除去した。沈降したプロトプラストに0.5mLのSMH-PVP培地1mLを加えてゆるやかに懸濁後30℃で2時間ゆるやかに振とう培養し、一定量をカナマイシン700μg/mL濃度を含む再生培地(重層寒天培地を用いる。下層寒天培地はDHS培地[グルコース5g/L、カザミノ酸5g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.5g/L、KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> 1.5g/L、PVP30g/L、MgCl<sub>2</sub> 0.4g/L、コハク酸2ナトリウム135g/L]に15g/Lの寒天を添加して作成し、上層寒天培地は上記DHS培地に5g/Lの寒天を添加して作成する。プロトプラスト懸濁液と溶解した上層寒天培地3mLとを混合して、下層寒天培地上に重層する)に植菌し、32℃で5日間培養した。出現したカナマイシン耐性形質転換株を4μg/mL濃度のカナマイシンを含有するL-寒天

培地(L-プロスに15g/Lの寒天を添加した培地)上で純化し、バチルス・ズブテリス168 MA3(pUB110)を得た。

ベクターpUB110を保持したバチルス・ズブチリス168 MA3(*Bacillus subtilis* 168 MA3)をカナマイシン(4μg/mL)を含む200mL-L-プロスに植菌し、37℃にて一塊培用した。得られた培養液を集菌し、15%シューカロース、50mMトリス-HCl(pH 8.5)、50mM EDTA、5mg/mLリゾチウム(シグマ社)よりなる水溶液2mLに懸濁し、37℃にて30分間反応させた。次にトリトン溶液(0.1%トリトンX-100)、50mMトリス-HCl、50mM EDTA、pH 8.5)2mLを加えて37℃にて30分間保持した。次にこの培液を5℃にて30,000rpm(64,000g)で1時間遠心分離し上清を回収し、IE緩衝液を加えて18mLとした。この液に、10μg/mLのエチジウムプロマイド水溶液1.2mLと塩化セシウム18.64gとを加えて静かに溶解し、40,000rpm(100,000g)、15℃で48時間遠心分離した。プラスミドpUB110は、紫外線照射により遠心チューブ中、2本のバンドの下方として見い

出され、このバンドを遠心チューブの側面から注射器で抜き取ることにより、プラスミドpUB110を分離した。次にこの分離液を等容量のイソプロピルアルコールで4回抽出し、エチジウムプロマイドを除去し、その後のTE緩衝液に対して透析して、DNA濃度100μg/mLのプラスミドpUB110の透析完了液1mLを得た。

#### (4) プラスミドpUX2の作成と該プラスミドの調製

プラスミドpUB110 DNA 5μgに対して20単位の制限酵素BamH I (TOYOBIO社より購入)を加えて、10mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、50mM NaCl、1mMジチオスレイトール(DTT)の緩衝液50μL中で37℃にて2時間反応させた。この反応液に等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度0.3Mになる様に加え、次に2倍容のエタノールを添加して-80℃で30分間保持した後、12,000rpm(8,800g)で10

分離遠心分離してDNA沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した(DNA試料XIII)。

DNA試料XIIIと3単位のT<sub>4</sub>DNAポリメラーゼ(T<sub>4</sub>DNA polymerase)(宝酒造株式会社より購入)とを、3mMトリス-HCl, COOK, 66mM CH<sub>3</sub>COOK, 10mM(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg<sup>2+</sup>, 0.5mMジオトレイトール、0.1mg/mlウシ血清アルブミン(BSA)(ベゼスダリサーチラボラトリーア社より購入)、0.1mM 2'-デオキシアデノシン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mM 2'-デオキシシチジン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mM 2'-デオキシグアノシン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mMチミジン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)の反応液44μl中で30℃にて20分間反応させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-80℃にて3時間保持した。次に12,000rpm(8,800g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した(DNA試料XIV)。

0℃で30分間保持した後、12,000rpm(8,800g)で室温で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収しこれを減圧乾燥した(DNA試料XVI)。

DNA試料XVI全量に対して、15単位の制限酵素Xba Iを加えて、50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaClの緩衝液50μl中で37℃にて、4時間反応させた。消化した試料は、前述と実質的に同様の方法により、15アガロースゲル電気泳動に供した。ただし電気泳動には、ベゼスダリサーチラボラトリーア社より購入したLKアガロースを使用し、4℃で電気泳動した。次にエチジウムプロマイドで染色したアガロースゲルを紫外線照射下に置き、4.1キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。切り出したアガロースゲルにその重量の3倍量のTE緩衝液を加えて、65℃で10分間加熱し、アガロースゲルを完全にとかした。次に等容のフェノールを添加して搅拌後、水層を回収した。得られた水層に、等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、次に2倍容のエタノールを添加して、-80℃にて30分間保持した。得られた水層に、酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に添加し、更に2倍容のエタノールを加えて搅拌の後、-80℃にて30分間保持した。その後10,000rpm(8,000g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収した。次に、得られた沈殿を減圧乾燥した。得られたDNA試料を50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジオトレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP、0.1mg/ml BSAの緩衝液50μlに溶解し、3単位のT<sub>4</sub>ファージDNAリガーゼを添加して15℃にて一晩反応させた。該反応液全量を用いて前記実施例2-(1)-(4)の方法によりバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168MA3(竣工研承寄第1042号)のプロトプラストを形質転換し、バチルス・ズブチリス168MA3(pUX2)を得た。

Xba I リンカー(Xba I linker)(宝酒造株式会社より購入)1.5μgとT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼ(T<sub>4</sub> Polynucleotide kinase)(宝酒造株式会社より購入)2.5単位とを、66mMトリス-HCl(pH 7.6)、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mMスペルミジン、15mMジオトレイトール、0.2mg/ml BSAの反応液10μlの中で37℃にて1時間反応させた(DNA試料XV)。

DNA試料XIV全量とDNA試料XV全量とT<sub>4</sub>ファージDNAリガーゼ(T<sub>4</sub> Phage DNA ligase)(宝酒造株式会社より購入)5単位とを、66mMトリス-HCl(pH 7.6)、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mMスペルミジン、15mMジオトレイトール、0.2mg/ml BSAの反応液22μl中で22℃にて4時間反応させた。この反応液にTE緩衝液を加えて100μlとし、これに等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、次に2倍容のエタノールを添加して、-80℃にて30分間保持した。得られた水層に、酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に添加し、更に2倍容のエタノールを加えて搅拌の後、-80℃にて30分間保持した。その後10,000rpm(8,000g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収した。次に、得られた沈殿を減圧乾燥した。得られたDNA試料を50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジオトレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP、0.1mg/ml BSAの緩衝液50μlに溶解し、3単位のT<sub>4</sub>ファージDNAリガーゼを添加して15℃にて一晩反応させた。該反応液全量を用いて前記実施例2-(1)-(4)の方法によりバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168MA3(竣工研承寄第1042号)のプロトプラストを形質転換し、バチルス・ズブチリス168MA3(pUX2)を得た。

バチルス・ズブチリス168MA3(pUX2)より、前記実施例2-(1)-(4)と全く同様の方法でプラスミドpUX2を制製し、90μg/ml濃度のプラスミドpUX2を含むTE緩衝液1.6mlを得た。

プラスミドpUX2 5 $\mu$ gに対して20単位の制限酵素Xba Iを加えて、50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaClの緩衝液50 $\mu$ l中で37℃にて2時間反応させた。この反応液に等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度0.3Mとなる様に加え、次に2倍容のエタノールを添加して-80℃で30分間保持した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した(DNA試料X VII)。

#### (5) 組換え体プラスミドの作成と該プラスミドの枯草菌への移入

DNAの試料X II 2 $\mu$ gとDNA試料X VII 1 $\mu$ gと3単位のT<sub>4</sub>ファージDNAリガーゼとを、50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジオトレイトル、1mMスペルミジン、1mM ATP、0.1mg/ml BSAの緩衝液50 $\mu$ l中で15℃にて一晩反応させた。その後、70℃にて10分間加熱することにより、反

応を停止させた。この反応液全量を用いて、前記実施例2-(1)-(4)と同様の方法によりバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(微生物研桑寄第1042号)を形質転換し、得られたテトラサンクリン耐性形質転換株について下記のごく試験した。

#### (6) コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物研桑寄第558号)のAH産生遺伝子を有する枯草菌の選択分離

前記実施例2-(1)-(5)で得られた菌株を、50mg/lのトリプトファンと4 $\mu$ g/mlのカナマイシンを含有した、スピッシャイゼンの最少毒天培地で培養し、生育の有無を調べた。その結果、カナマイシン耐性、グルタミン酸非要求性を示す菌株が得られ、該菌株を目的のAH遺伝子を保有した枯草菌バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(pAG501)として分離した。

該枯草菌のAH活性を、下記の方法で測定することにより、クローニングした遺伝子がAH産生遺伝

子であることを確認した。

L-プロス(カナマイシン耐性株を培養する場合にはカナマイシン4 $\mu$ g/mlを添加した)200mlで、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA113、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(pUX2)およびバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(pAG501)をそれぞれ振とう培養した。該培養液より菌体を遠心分離により集め、0.8%のNaCl水溶液で洗浄後、12mlのMES緩衝液[50mM Z-(N-モルフォリノエタンスルホン酸: MES、10mM MnSO<sub>4</sub>、10mM EDTA、pH 7.0]に懸濁した。これを、ブラウン社(西独)製のMSKセルホモジナイザー(853021型)で処理した後、14,000rpm(20,000g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。

AH活性は2.6nMの酵素反応液(77mMトリス-HCl(pH 7.2)、115mM NaCl、0.115mMシス-アコニット酸、50 $\mu$ gの細胞抽出液)の30℃における240nmの吸光度の減少を、日立分光光度計(223型)で測

定することにより求めた。

また、細胞抽出液の蛋白質濃度の測定には、ローリーら(オー・エイチ・ローリー、エヌ・ジェイ・ローウェブロー、アール・ジェイ・ランダル、ジェイ・バイオル・ケム、193巻265頁1951年(O.H.Lovvy, N.J.Robertson, R.J.Randall, J.Biol.Chem. 193, 265(1951)])の方法を用いた。尚、同測定の標準蛋白質として、ウシ血清アルブミン(和光純薬工業社より購入)を用いた。測定結果を第6表に示した。第6表のAH比活性測定結果より、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(pAG501)は明らかにAH活性を回復していた。

(以下余白)

第6表

菌株	AH比活性 <sup>a</sup>
M1113 <sup>b</sup>	5.28
MA3 <sup>c</sup>	0.000
MA3(pUX2)	0.000
MA3(pAG501)	0.018

注1) 反応液中の蛋白質1mgが、1分間に消費したシス-アミニット酸のマイクロモル数で表示している。

注2) バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)168の野生型AH株である。

注3) バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)168のAH欠損株である。

(以下余白)

ドゲル上で同時に電気泳動したファイエックス174ファージ(+X174phage)DNAの制限酵素HaeIIIによる消化断片(ベゼスダリサーチラボラトリー社より購入)の既知の分子の長さに基づいて算出した。更に、複数の制限酵素処理によって生じた消化断片を解析することにより、プラスミド分子中の各制限酵素切断部位を決定した。得られたプラスミドpAG501の制限酵素切断地図を第12図に示す。

第12図から明らかのように、プラスミドpAG501はベクターpUX2の制限酵素XbaI切断部位に、約4.7キロベースのAH産生遺伝子を含む外来のXbaI断片が組込まれていた。このXbaI断片がコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(株式会社第558号)由來のAH産生遺伝子を含むDNA断片である。

プラスミドpAG501のDNAにより、前記実施例2-(1)-(4)と同様の方法で、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3を形質転換した。その結果、調べた形質転換株は、全てカナマイシン耐性かつグルタミン酸非要求性であった。

#### (7) 複合プラスミドpAG501の分離と解析

バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)168 MA3(pAG501)より、前記実施例2-(1)-(3)と同様の方法でプラスミドpAG501のDNAを120μg分離精製した。このDNA0.3μgに対して、各々過剰の制限酵素(EcoRI, BamHI, BglII, HindIII, KpnI (TOY-OBO社より購入), MluI (宝酒造より購入), PstI, PvuII, SacI, SalI, XbaI, XbaI (TOY-OBO社より購入))を、それぞれの適正条件にて反応させ、その消化した試料を前述の方法により1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動の終ったゲルを1μg/mlエチジウムプロマイド水溶液に浸漬して30分間染色した後、紫外線をゲルに照射して生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から各々の分子の長さを算出した。尚、分子の長さは、同一アガロースゲル上で同時に電気泳動したラムダファージ(λ phage)DNA(ニッポンジーン社より購入)の制限酵素HindIIIによる消化断片の既知の分子の長さに、または同一ポリアクリルアミ

ドゲル上で同時に電気泳動したファイエックス174ファージ(+X174phage)DNAの制限酵素HaeIIIによる消化断片(ベゼスダリサーチラボラトリー社より購入)の既知の分子の長さに基づいて算出した。更に、複数の制限酵素処理によって生じた消化断片を解析することにより、プラスミド分子中の各制限酵素切断部位を決定した。得られたプラスミドpAG501の制限酵素切断地図を第12図に示す。

#### (8) AH産生遺伝子を含む約4.7キロベースのDNA断片の分離

前記実施例2-(1)-(7)で調製したプラスミドpAG501のDNA 20μgに対して、50単位の制限酵素XbaIを加えて、50mMトリス-HCl(pH 7.4), 10mM MgSO<sub>4</sub>, 100mM NaClの緩衝液100μl中で37℃にて2時間反応させた。消化した試料は、前記の方法により、1%アガロースゲル電気泳動に供した。ただし、ベゼスダ・リサーチ・ラボトリー社より購入したLMPアガロースを使用し、4℃で電気泳動した。次にエチジウムプロマイドで染色したアガロースゲルを紫外線照射下に置き、AH産生遺伝子を含む約4.7キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。該アガロースゲルにその重量の2倍量のTE緩衝液を加えて、65℃で10分間保持し、アガロースゲルを

完全にとかした。次に等容のフェノールを添加して搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになるように添加し、更に2倍容のエタノールを加えて搅拌の後、-80°Cにて30分間保持した。その後、10,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した。得られた試料をBAPF緩衝液(50mMトリス-HCl、pH 8.4)200μlに溶解し、バクテリアル・アリカリ・ホスファターゼ(Bacterial alkaline phosphatase)(宝酒造株式会社より購入)を1単位添加して65°Cにて30分間反応させた。更に同じ酵素を1単位添加して65°Cで30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で飽和したフェノールを加え、混合した後12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離して水層を回収し、更にもう1回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して混合した後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収した。次に、同沈殿を減圧乾燥後、TE緩衝液20μlに溶解した。

#### (9) プラスミドpAG50へのAH産生遺伝子を含むDNA断片の組込み

前記実施例1工程[1]-(8)-④で調製したプラスミドpAG 50のDNA5μgに対して、制限酵素Xba Iを15単位加えて、50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaClの緩衝液50μl中で、37°Cにて2時間反応させた。その後、70°Cで10分

間加熱して、反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保持した。その後、12,000rpm(8,900g)で10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収した。これを減圧乾燥した。このDNA全量と前記実施例2-[1]-(8)で調製したDNA1μgと3単位のT<sub>4</sub>ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購入)とを、50mMトリス-HCl(pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジオトレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP、0.1mg/ml BSA(Bovine serum albumin)(ベゼスダリサーチラボラトリー社より購入)の緩衝液50μl中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。

#### (10) AH産生遺伝子を含有した複合プラスミドpAG5001の取得

前記実施例2-[1]-(8)で作成した組換え体DNAにより、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(農研集客第568号)を形質転換した。前記実施例1工程[1]-(8)-④に記載の方法で得られたテトラサイ

クリン耐性形質転換株の保有するプラスミドを解析することにより、目的プラスミドを取得した。得られたプラスミドをpAG5001と命名した。得られたテトラサイクリン耐性形質転換株を、テトラサイクリン10μg/mlを含むLG寒天培地(LG寒天培地にグルコース5g/lを添加した培地)上で純化した後、各菌株から前記実施例1工程[1]-(8)-④と同様の方法により、プラスミドを分離し、前記実施例1-[1]-(6)と同様の方法によりそれらのプラスミドを解析した。その結果、プラスミドpAG5001を取得した。プラスミドpAG5001は、第13図に示した様に、プラスミドpAG50の制限酵素Xba I切断部位に、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由來のAH産生遺伝子を含む約4.7キロベースのDNA断片が組込まれた複合プラスミドである。

#### (11) プラスミドpAG5001保有菌株のAH活性の測定

プラスミドpAG5001保有のコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801を、

テトラサイクリン $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有の前記培養液で $50\text{mL}$ で、 $32^\circ\text{C}$ にて一塊擴とう培養した。ただし、プラスミド非保持株は、テトラサイクリン無添加で培養した。この培養液より集菌し、 $0.8\% \text{NaCl}$ 水溶液 $20\text{mL}$ で2回洗浄後、前記MES緩衝液 $10\text{mL}$ に懸濁した。これを、ブラウン社製(西独)のMSKセルボモジナイザー(853021型)で処理した後、 $14,000\text{rpm}$ ( $20,000\text{g}$ )で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。この細胞抽出液を用いて、前記実施例1-(1)-(6)と同様の方法により、AH活性を測定した。その結果、第7表に示した様に、プラスミドpAG5001保持菌株は、ベクター-pAG50保持菌株やプラスミド非保持菌に比べて、高いAH比活性を示した。

(以下省略)

第7表

菌株	AH比活性 <sup>1)</sup>
801 <sup>2)</sup>	0.213
801(pAG50)	0.109
801(pAG5001)	3.95

注1) 第6表の注1)と同じ。

注2) 第2表の注2)と同じ。

故に、プラスミドpAG5001にふくまれている約4.7キロベースのXbaI断片には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のAH産生遺伝子が含まれていることは明らかである。

#### (12) AH遺伝子を含むDNA断片の分離

pAG5001DNAを前記実施例1-(3)-(1)に記載の方法で $100\text{mL}$ の培養液から約 $60\mu\text{g}$ (DNA濃度約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ )を得た。本プラスミドDNA約 $10\mu\text{g}$ 相当分を、 $50\text{mM}\text{Tris}-\text{HCl}(\text{pH}7.5)$ 、 $100\text{mM}\text{NaCl}$ 、 $10\text{mM}\text{MgCl}_2$ の緩衝液 $400\mu\text{L}$ 中で20単位のXbaIを添加して $37^\circ\text{C}$ で2時間反応させることにより切断し、前記実施例1-(2)に記載のLMP

アガロースを用いたアガロースゲル電気泳動を行った。AH遺伝子を含む約 $4.7\text{kb}$ のDNA断片を実施例1-(7)と同様にゲルから抽出し、該DNA断片約 $2\mu\text{g}$ を取得した(AH断片: DNA試料XVII)。

#### (2)pIG101からの $6.8\text{kb}$ および $6.5\text{kb}$ のXbaI断片の調製

実施例1で得られたpIG101DNA約 $10\mu\text{g}$ を20単位のXbaIにより切断後LMPアガロースを用いたアガロースゲル電気泳動を行った。pIG101はXbaI切断により $6.8\text{kb}$ 、 $6.5\text{kb}$ および $3.0\text{kb}$ の3断片に分かれるが、 $6.8\text{kb}$ と $6.5\text{kb}$ の断片をそれぞれ別個に調製することは困難であったので、これら2断片を混合物のまま抽出した。すなわち、 $6.8\text{kb}$ および $6.5\text{kb}$ のバンドの部分のアガロースゲルをまとめて切出し、前記実施例1-(3)の方法でこれら断片の混合物約 $5\mu\text{g}$ を得た(DNA試料XVIII)。

#### (3)組換えプラスミドの作製

前記DNA試料XVIIおよびDNA試料XVIIIの全量を用いて、前記実施例1-(3)および1-(4)と

実質的に同様の方法により、リガーゼ反応とコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801の形質転換を行った。得られたテトラサイクリン耐性形質転換株約60株について前記実施例1-(5)に記載したアルカリ溶菌法により、それぞれ少量のプラスミドDNAを調製した。各プラスミドDNAサンプルの半量をまずXbaIで切断し、電気泳動で $6.8\text{kb}$ 、 $6.5\text{kb}$ 、および $4.7\text{kb}$ の3断片が確認できるものを選択後、これらについて残り半量のサンプルを用いてSall処理で $3.4\text{kb}$ の断片が生じるものを探してスクリーニングした。その結果、目的の構造を持つプラスミドが2種得られ、そのうちの1種をpAG321と命名して詳しい解析を行った。

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAG321)より前記実施例1-(3)の方法でpAG321DNAを約 $50\mu\text{g}$ (約 $45\mu\text{g}/\text{mL}$ )取得した。本プラスミドDNAを用いて前述の方法により制限酵素による切断点地図を決定した。その結果、pAG321はpIG101の $3.0\text{kb}$ のXbaI

SI断片の代わりにAH遺伝子を含む4.7kbのXbaI-SI断片が組み込まれたプラスミドであることが判明した。得られたプラスミドpAIG321の制限酵素切断地図を第14図に示す。

## (4)pAIG321保持菌の酵素活性の測定

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAIG321)を50mLの培養培地で培養し、前記実施例1-(6)と全く同じ方法で細胞抽出液を調製した。本細胞抽出液のG DH活性およびICDH活性を前記実施例1-(6)の方法で測定した。またAH活性については下記の方法で測定を行なった。AH活性は、2.6mLの酵素反応液(77mM Tris-HCl(pH7.2)、115mM NaCl、0.115mMシス-アコニット酸、10~50μLの細胞抽出液)の30℃における240nmの吸光度の減少を日立分光光度計(228型)で測定することにより測定した。これらの結果およびプラスミドを保持しないコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801の細胞抽出液を用いた場合の結果を第2表に示した。本結果より明らかなるよ

うに、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAIG321)はAH、ICDHおよびG DHの3種の酵素が同時に強化された菌株であった。

第8表

菌株	AH <sup>(1)</sup>	ICDH <sup>(2)</sup>	G DH <sup>(3)</sup>
801 <sup>(4)</sup>	0.44	0.73	0.84
801(pAIG321)	1.5	2.4	3.1

注1) 第6表の注1)と同じ

注2) 第3表の注1)と同じ

注3) 第1表の注1)と同じ

注4) 第2表の注2)と同じ

(以下余白)

## 実施例3

実施例では、CS+ICDH+G DHの3重強化株を作成した例を示す。またCS+ICDHの2重強化株およびCS+G DHの2重強化株を作成した例についても同時に示す。

組換えプラスミドを作製する際の材料としては前述のpAG1001、pAG3001の他にCS遺伝子を含む組換えプラスミドpAG4003を用いた。pAG4003はコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801のベクタープラスミドpAG50の約0.7kb BamHI-SalI断片の代わりに、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801由来のCS遺伝子を含む約3.2kb BamHI-SalI断片が組み込まれた組換えプラスミドであり。本プラスミドの作製方法は特開昭51-279888に詳細に記述されている。

## (1)組換えプラスミドpAG4003の調製

(1)コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微工研条寄558号)のCS産生遺伝子を有する大腸菌の選択分

## ■

① コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微工研条寄第568号)からの全DNAの調製とその切断

実施例1工程(1)-(1)に記載と同様の方法によりDNA濃度0.85mg/mLの全DNA溶液を得た。

全DNAの切断のためには、128μgの全DNAに対して、13単位の制限酵素XbaI(ニッポンジーン社より購入)を加え、50mM Tris-HCl(pH7.4)、1.0mM MgSO<sub>4</sub>、1.00mM NaCl、の緩衝液200μL中で37℃にて2時間反応させた。その後70℃で10分間加熱して反応を停止させた。(DNA試料XX)

② ベクターpBR325の開裂と開裂とXbaIリシンカーゼの組込み

先づ、ベクターpBR325をエシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 W620に移入し、得られた形質転換株からpBR325を調製した。即ち、エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 W620に

richia coli) K12 W620を50mℓのL-プロス(ポリペプトン10g/l、酵母エキス5g/l、NaCl 5g/l pH7.2)に植菌し、37℃にて菌濃度 $5 \times 10^6$ 個/mℓまで増殖させた後、2℃で凍結した。該菌体を50mℓの氷冷した100mM MgCl<sub>2</sub>水溶液に懸濁し、集菌後更に25mℓの氷冷した100mM CaCl<sub>2</sub>水溶液に懸濁した。氷中で30分保持した後、集菌して再度5mℓの氷冷した100mM CaCl<sub>2</sub>水溶液に懸濁し、氷中で1時間保持した〔コンピテントセル(Competent cell)〕。この菌懸濁液200μlに0.1μgのpBR325 DNAを添加して、氷中で1時間保持した。その後42℃にて2分間保持した後、5mℓのL-プロスを添加して、37℃にて90分間静置培養した。得られた培養液を適当に希釈して、10μg/mlのテトラサイクリンを添加したL-寒天培地(L-プロスに15g/lの寒天を添加した培地)に塗布し37℃で一塊培養した。得られたpBR325による形質転換株エシェリヒアコリK12 W620(pBR

離した。ベクター-pBR325は、紫外線照射により遠心チューブ中、2本のバンドの下方として見い出され、このバンドを遠心チューブの側面から注射器で抜き取ることにより、ベクター-pBR325を分離した。次にこの分離液を等容量のイソプロピルアルコールで4回抽出して、エチジウムプロマイドを除去し、その後にTE緩衝液に対して透析して、DNA濃度190μg/mlのベクター-pBR325の透析完了液1mlを得た。

ベクター-pBR325 DNA 5μgに対して20単位の制限酵素EcoRIを加えて、50mM Tris-HCl(pH7.4)、10mM MgSO<sub>4</sub>、100mM NaCl、の緩衝液50μl中で37℃にて2時間反応させた。その後、70℃で10分間加熱して反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30℃にて3時間保持した。次に12,000 rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、回沈殿を減圧乾燥した(DNA試料XXI)。

325)より、以下のようにして該ベクターの調製を行った。

ベクター-pBR325を保持したエシェリヒアコリ(Escherichia coli) K12 W620を、100mℓのテトラサイクリン(10μg/ml)を含むL-プロスに植菌し、37℃にて一塊培養した。得られた培養液より集菌しTE緩衝液で洗浄後、15%シューカロース、50mM Tris-HCl(pH8.5)、50mM EDTA、2mg/mlリゾチウム(シグマ社)よりなる水溶液2mℓに懸濁し、室温にて30分間反応させた。次にトリトン溶液(0.1%トリトンX-100(Triton X-100)、50mM Tris-HCl、50mM EDTA、pH8.5)2mℓを加えて37℃にて30分間保持した。次にこの溶液を、5℃にて30,000 rpm(64,000g)で1時間遠心分離し上清を回収し、TE緩衝液を加えて18mℓとした。この液に、10mg/mlのエチジウムプロマイド水溶液1.2mℓと塩化セシウム18.64gとを加えて静かに溶解し、40,000 rpm(100,000g)、15℃で48時間遠心分

DNA試料XXIと3単位T<sub>4</sub>DNAポリメラーゼ(T<sub>4</sub>DNA polymerase)(宝酒造株式会社より購入)とを、33mM Tris-CH<sub>3</sub>COOK(pH7.9)、66mM CH<sub>3</sub>COOK、10mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg、0.5mMジチオトレイール、0.1mg/ml BSA(Bovine serum albumin)(ベゼスダリサーチラボラトリー社より購入)、0.1mM 2'-デオキシアデノシン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mM 2'-デオキシシチジン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mM 2'-デオキシグアノシン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)、0.1mM チミジン5'-トリホスフェート(シグマ社、米国より購入)の反応液44μl中で30℃にて20分間反応させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30℃にて3時間保持した。次に12,000 rpm(8,900g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、得られた沈殿を減圧乾燥した(DNA試料XXII)。

Xba I リンカー(Xba I linker)(宝酒造株式会社より購入)1.5 μgとT.ポリヌクレオチドキナーゼ(T. Polynucleotide kinase)(宝酒造株式会社より購入)2.5 単位とを、6.6 mM Tris-HCl(pH 7.6)、1 mM ATP、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン、1.5 mM ジチオトレイトイール、0.2 mg/ml BSA の反応液10 μl 中で37°Cにて1時間反応させた(DNA試料XXIII)。

DNA試料XXIIIの1/2量とDNA試料XXIII全量とT.ファージDNAリガーゼ(T. Phage DNA ligase)(宝酒造株式会社より購入)6単位とを、6.6 mM Tris-HCl(pH 7.6)、1 mM ATP、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン、1.5 mM ジチオトレイトイール、0.2 mg/ml BSA の反応液22 μl 中で22°Cにて4時間反応させた。この反応液に等容のフェノール・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して搅拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して搅拌の後、水層を回収した。そこへ酛酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、次に2倍容のエタノール

一ル・クロロホルム(1:1, v/v)液を添加して、搅拌の後水層を回収した。得られた水層に等容のクロロホルムを添加して搅拌後、水層を回収した。得られた水層に、酛酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に添加し、更に2倍容のエタノールを加えて搅拌の後、-30°Cで3時間保持した。その後10,000 rpm(9,000 g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収した。次に、得られた沈殿を減圧乾燥した(DNA試料XXV)。

#### ② 組換え体プラスミドの作成

DNA試料XX 2 μgとDNA試料XXV全量と3単位のT.ファージDNAリガーゼとを、5.0 mM Tris-HCl(pH 7.4)、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1.0 mM ジチオトレイトイール、1 mM スペルミジン、1 mM ATP、0.1 mg/ml BSA の緩衝液4.0 μl 中で、15°Cにて一晩反応させた。その後70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。

#### ③ 組換え体プラスミドの大腸菌への移入

前記工程②の方法により、エシエリヒア・コリ

を添加して、-30°Cで3時間保持した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収しこれを減圧乾燥した(DNA試料XXIV)。

DNA試料XXIV全量に対して、15単位の制限酵素Xba I を加えて、5.0 mM Tris-HCl(pH 7.4)、1.0 mM MgSO<sub>4</sub>、1.0 mM NaClの緩衝液5.0 μl 中で37°Cにて、2時間反応させた。消化した試料は、前記の方法により、1%アガロースゲル電気泳動に供した。ただし電気泳動には、ベゼスダ・リサーチラボラトリーソリューションより購入したLMPアガロースを使用し、4°Cで電気泳動した。次にエチジウムプロマイドで染色したアガロースゲルを紫外線照射下に置き、6.0キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。切り出したアガロースゲルにその重量の3倍量のTE緩衝液を加えて、65°Cで10分間加熱し、アガロースゲルを完全にとかした。次に等容のフェノールを添加して搅拌後、水層を回収した。得られた水層に、等容のフェノ

(Escherichia coli) K12 W620のコンピテントセル(Competent cell)を調製した。得られた細胞懸濁液400 μl と前記工程③の反応液4.0 μlとを混合して、氷中に1時間保持した。その後、42°Cにて2分間加熱した後、5 μl のL-プロテスを添加して37°Cにて90分間静置培養した。次に、得られた培養液から集菌し、無菌水に懸濁した。得られた懸濁液を、テトラサイクリン(1.0 μg/ml)を添加した合成寒天培地(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/ml, クエン酸(Citric acid·1H<sub>2</sub>O) 2g/ml, 無水リシン酸水素二カリウム(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·anhydrous) 10g/ml, NaNH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 3.5g/ml, グルコース1g/ml, 寒天1.5g/ml, 塩酸チアミン5 μg/ml, ウラシル 35μg/ml)に塗布して培養した。この様にして得られた菌株を、アンビシリン(3.0 μg/ml)とテトラサイクリン(1.0 μg/ml)とを含む前記合成寒天培地で培養し、生育の有無を調べた。その結果、アンビシリン耐性テトラサイクリン耐性グルタミン酸非要求性を示す菌株を目的のCS産生遺伝子を保有した大腸菌エシエリヒア・コリ

(*Escherichia coli*) K12 W620 (pAG401) として分離した。

該大腸菌のCS活性を、下記の方法で測定することにより、クローニングした遺伝子がCS産生遺伝子であることを確認した。合成液体培地（前記合成寒天培地より寒天を削除した培地組成）50 mlで、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620 (pAG401)を振盪培養した。該大腸菌を集菌後、0.8%のNaCl水溶液10 mlで洗浄し、2 mlのMBS緩衝液(50 mM 2-(N-モリフォリノエタンスルホン酸)MBS, 10 mM MnSO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, pH 7.0)に懸濁した。これを超音波処理した後、14,000 rpm (20,000 g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵素液)を調製した。尚、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620 (pBR325)を培養する場合には、前記合成液体培地にグルタミン酸ナトリウム(MSG) 0.5 g/lを添加した。エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620 (pAG401)、エシェリヒア・コリ

(*Escherichia coli*) K12 W620 (pBR325)を培養する場合には、前記合成液体培地にテトラサイクリン 10 μg/mlを添加した。

CS活性は、3.0 mlの酵素反応液(95 mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.2 mMオキザロ酢酸、0.1 mM 5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、0.16 mM アセチル-CoA、10 μl細胞抽出液)の412 nmの吸光度の増大を、日立分光光度計(228型)で測定することにより求めた。

また、細胞抽出液の蛋白質濃度の測定には、ローリーら(オー.エイチ.ローリー、エヌ.ジェイ.ローウェブロー、アル.ジェイ.ランダル、ジェイ.バイオル.ケム.193巻265頁1951年(O.H.Lovvy, N.J.Rövekamp, R.J.Randall, J.Biol.Chem., 193, 265 (1951)))の方法を用いた。尚、同測定の標準蛋白質として、ウシ血清アルブミン(和光純薬工業社より購入)を用いた。測定結果を第1表に示した。第1表のCS比活性測定結果より、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620 (pAG401)は、明らかにCS活性を回復していた。

#### (2) 混合プラスミドpAG401の分離と解析

エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12 W620 (pAG401)より、前記実施例1-(1)-(2)の方法でプラスミドpAG401のDNAを、160 μg 分離精製した。このDNA 0.3 μgに、10単位の制限酵素EcoRI(ニッポンジーン社より購入)、10単位の制限酵素BamHI(ニッポンジーン社より購入)、10単位の制限酵素HindIII(ニッポンジーン社より購入)、10単位の制限酵素PstI(ベゼスダリサーチラボラトリーソリューション社より購入)、10単位の制限酵素SalI(ニッポンジーン社より購入)、10単位の制限酵素XbaI(ニッポンジーン社より購入)の少なくとも1種類の制限酵素を加えて、それぞれの適正酵素液20 μl中にて、37°Cで2時間反応させた。消化した試料は、マニアティスら(チー.マニアティス.イー.エフ.フリッチュ.ジェイ.サンブルック:モレキュラークローニングアラボラトリーマニュアル、コールドスプリングハーバーラボラトリ、

コールドスプリングハーバー エヌ.ワイ.(T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook: Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.) 150-185頁 1982年)の方法により、1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動の終ったゲルを1 μg/mlエチジウムプロマイド水溶液に浸漬して30分間染色した後、紫外線をゲルに照射してゲル上に観察されるバンドの数から生成DNA断片の数を判定し、各断片の泳動距離から各々の分子の長さを算出し、それらを加算してプラスミドpAG401の分子中の各制限酵素切断部位を決定した。各DNA断片の分子の長さの決定には、1 kb以上の分子の長さについては1%アガロースゲル電気泳動を用い、約0.1 kbから1 kb未満の分子の長さについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。尚、分子の長さのマークとしては、同一アガロースゲル上で同時に電

気休動したラムダファージDNA(ニッポンジーン社より購入)の制限酵素K HindIIIによる消化断片と、同一ポリアクリルアミドゲル上で同時に電気休動したファイエックス174ファージDNAの制限酵素HaeIIIの消化断片(ベゼスダリサーチラボラトリーア社より購入)とを用いた。このようにして得られたプラスミドpAG401の制限酵素切断地図を第15図に示す。

第15図から明らかなように、プラスミドpAG401は、ベクター-pBR325の制限酵素EcoRI切断部位にXbaIリソマリーゼを組込んで作成したベクターの制限酵素XbaI切断部位に、約4.8キロベースのCS産生遺伝子を含む外来のXbaI断片が組込まれていた。このXbaI断片が、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物検査第558号)由来のCS産生遺伝子を含むDNA断片である。

プラスミドpAG401のDNAにより、前記実験例1-(1)-(2)の方法で、エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12 W620を形質転換した。

ト(Herbert and Guest)、ジェイ・ゲン、マイクロバイオル.(J. Gen. Microbiol.)53: 363 (1968)。尚、該菌株は、イー・コリ・ジェネティック・ストック・センター[イー・コリ・ジェネティック・ストック・センター、デパートメント・オブ・ヒューマン・ジェネティックス、エル・ユニバーシティー・スクール・オブ・メディシン、333・シーダー・ストリート・ビー・オー・ボックス3333、ニューヘイブン、コネチカット06510アメリカ合衆国(E. coli Genetic Stock Center, Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street P.O.Box 3333 New Haven, Connecticut 06510 U.S.A.)]のバーバラ・ジェイ・バックマン(Barbara J. Bachman)より分譲を受けることができる。

(3) CS産生遺伝子を含む約4.8キロベースのDNA断片の分離

前記工程(1)-(2)で調製したプラスミドpAG401のDNA 20 μgに対して、60単位の制限酵素XbaIを加えて、50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、10 mM

その結果、調べた形質転換株は、全てテトラサイクリン耐性アンビシリソル耐性グルタミン酸非要求性であった。更に、該形質転換株について、それらが保有するプラスミドを解析した結果、それらのプラスミドは、供与プラスミドと比べて制限酵素切断模式で同一と判定されるプラスミドであった。

第9表

菌株	CS比活性 <sup>2)</sup>
W620 <sup>3)</sup>	0.02
W620 (pBR325)	0.02
W620 (pAG401)	0.16

注1) 反応液中の蛋白質1 mgが、1分間に生成させたクエン酸のマイクロモル数で表示してある。実際には、クエン酸と同時に生成するコエンザイムAを、SH基定量試薬(DTNB)を用いて定量した。

注2) ジェイ・アール・ゲスト(J.R.Guest)より分譲をうけたエシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12のCS欠損株である(ハーバート・アンド・ゲス

MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液100 μl中で37°Cにて2時間反応させた。消化した試料は、前記の方法により、1メガアガロースゲル電気休動に供じた。ただし、ベゼスダ・リサーチ・ラボラトリーア社より購入したLMPアガロースを使用し、4°Cで電気休動した。次にエチジウムプロマイドで染色したアガロースゲルを紫外線照射下に置き、CS産生遺伝子を含む約4.8キロベースのDNA断片の存在を確認し、その付近のアガロースゲルを切り出した。該アガロースゲルにその重量の3倍量のTE緩衝液を加えて、65°Cで10分間保持し、アガロースゲルを完全にとかした。次に、等容のフェノールを添加して、搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、等容のフェノール・クロロホルム(1:1,v/v)液を添加して、搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、等容のクロロホルムを添加して、搅拌の後、水層を回収した。得られた水層に、酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになるように添加し、更に2倍量のエタノールを加えて搅拌の後、-30°Cにて3時間保持した。その後、10,000 rpm

(9,000  $\times$  g)で10分間遠心分離して、DNAの沈殿を回収した。次に、同沈殿を減圧乾燥後、TE緩衝液 $20 \mu\text{L}$ に溶解した。以上の操作により、CS産生遺伝子を含む約4.9キロベースのDNA断片を、約3  $\mu\text{g}$ 取得した。

(以下余白)

(4) プラスミドpAG50へのCS産生遺伝子を含むDNA断片の組込み

前記実施例1工程〔1〕-〔8〕-④で調製したプラスミドpAG50のDNA 5  $\mu\text{g}$ に対して、制限酵素XbaIを15単位加えて、50 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液60  $\mu\text{L}$ 中で、37°Cにて2時間反応させた。その後、70°Cで10分間加熱して、反応を停止させた。この液に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加して、-30°Cにて3時間保持した。次に12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離してDNA沈殿を回収し、同沈殿を減圧乾燥した。得られた試料をBAPT緩衝液(50 mM Tris-HCl、pH 8.4)200  $\mu\text{L}$ に溶解し、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ(Bacterial alkaline phosphatase) (宝酒造株式会社より購入)を1単位添加して65°Cにて30分間反応させた。更に該酵素を1単位添加して、65°Cで30分間反応させた。その後、反応液に等容のTNE緩衝液で希釈したフェノールを加え、混合した後、12,000 rpm (8,900 g)で10分

させた。

(5) CS産生遺伝子を含有した複合プラスミドpAG4001の取得

前記実施例3-〔1〕-〔4〕で作成した組換えDNAにより、コリネバクテリウム・メラセコラ(Corynebacterium melassecola)801(微研染菌第558号)を形質転換した。実施例1工程〔1〕-〔8〕-④に記載と同様の方法で得られたテトラサイクリン耐性形質転換株の保有するプラスミドを解析することにより、目的プラスミドを取得した。得られたプラスミドをpAG4001と命名した。

得られたテトラサイクリン耐性形質転換株を、テトラサイクリン10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLG寒天培地(L-G寒天培地にグルコース5%を添加した培地)上で純化した後、各菌株から前記実施例1-〔1〕-〔1〕と同様の方法により、プラスミドを分離し、前記実施例1-〔1〕-〔6〕と同様の方法により制限酵素EcoRI、HindIII、PstI、SalI、XbaIを用いて、それらのプラスミドを解析した。その結果、プラスミドpAG4001を取得した。プラスミ

ド遠心分離して水層を回収し、更にもう1回同じ操作を繰り返した。次に水層に等容のフェノール・クロロホルム(1:1、v/v)液を添加して混合した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離し、水層を回収した。更に水層に等容のクロロホルムを添加して振拌した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離し、水層を回収した。該水層に酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになる様に加え、2倍容のエタノールを添加し振拌した後、-30°Cにて3時間保持した。その後、12,000 rpm (8,900 g)で10分間遠心分離し、DNA沈殿を回収した。これを減圧乾燥した。このDNA全量と前記実施例3-〔1〕-〔3〕で調製したDNA 1  $\mu\text{g}$ と3単位のT<sub>1</sub>、ファージDNAリガーゼ(ニッポンジーン社より購入)とを、50 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mMジチオトレイトール、1 mMスペルミジン、1 mM ATP、0.1 mg/mL BSA(Bovine serum albumin) (ベゼスダリサーチラボラトリー社より購入)の緩衝液50  $\mu\text{L}$ 中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止

D<sub>P</sub>AG4001は、プラスミドpAG50の制限酵素XbaI切断部位に、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のCS産生遺伝子を含む約4.8キロベースのDNA断片が組込まれた複合プラスミドである。得られたプラスミドpAG4001の制限酵素切断地図を第16図に示す。

#### (6) プラスミドpAG4001保有菌株のCS活性の測定

プラスミドpAG4001の保有のコリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801を、テトラサイクリン 10 μg/ml 含有の前記培養地50mlで、32°Cにて一晩振盪培養した。ただし、プラスミド非保持株は、テトラサイクリン無添加で培養した。この培養液より集菌し、0.8% NaCl水溶液20mlで2回洗浄後、前記MBS緩衝液10mlに懸濁した。これを、ブラウジ社製(西独)のMSKセルホモジナイザー(853021型)で処理した後、14000rpm(20000 g)で20分間遠心分離して、細胞抽出液(粗酵液)を調整した。この細胞抽出液を用いて、前記工程[1]-(2) の方法により、C

S活性を測定した。その結果、第10表に示した様に、プラスミドpAG4001保持菌株は、ベクターpAG50保持菌株やプラスミド非保持菌に比べて、高いCS比活性を示した。

第10表

菌株	CS比活性 <sup>①</sup>
801 <sup>②</sup>	0.50
801(pAG50)	0.52
801(pAG4001)	2.06
801(pAG4002)	2.07
801(pAG4003)	2.10

注1) 第9表の注1)と同じ。

注2) 第2表の注2)と同じ。

#### (7) CS産生遺伝子を含む約4.8キロベースのDNA断片の縮小化

前記実施例3-(1)-(5)で調製したプラスミドpAG4001のDNA 5 μgに対して、制限酵素BamHIを15単位加えて、10 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、50 mM NaCl、1 mM ジチオトレイトル

の緩衝液50 μl中で、37°Cにて2時間反応させた。そこへ等容のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して振拌の後、水層を回収した。更に等容のクロロホルムを添加して振拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナトリウムを最終濃度300 mMになるように加え、次に2倍容のエタノールを添加して、-30°Cで3時間保持した後、12000 rpm(8900 g)で10分間遠心分離してDNAの沈殿を回収し、これを減圧乾燥した(DNA試料XXVI)。前記実施例1工程[1]-(8)-④で調製したプラスミドpAG50のDNA 5 μgに対して、制限酵素BamHIを15単位加えて、10 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、50 mM NaCl、1 mM ジチオトレイトルの緩衝液50 μl中で、37°Cにて2時間反応させた。その後、前記実施例2-(2) の方法により、バクテリアル・アルカリ・ホスファターゼ処理、エタノール沈殿を行なった(DNA試料XXVII)。

前記のDNA試料XXVIとDNA試料XXVIIとの全量に対して、3単位のT<sub>1</sub>ファーボジDNAリガーゼを50 mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオ

トレイトル、1 mMスペルミジン、1 mM ATP、0.1 mg/ml BSFの緩衝液50 μl中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、-70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。このリガーゼ反応液を用いて、前記実施例1工程[1]-(8)-⑥の方法により、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微研集録第554号)を形質転換した。得られたテトラサイクリン耐性形質転換株をテトラサイクリン10 μg/mlを含む前記LG寒天培地上で純化した後、各株から前記実施例1工程[1]-(8)-①の方法によりプラスミドを分離し、制限酵素としてEcoRI、 HindIII、PstI、SalI及びXbaIを用いる以外は前記実施例1-(1)-(6)と同様の方法によりそれらのプラスミドを解析した。その結果、プラスミドpAG4002を取得した。プラスミドpAG4002は、プラスミドpAG50の制限酵素BamHI切断部位に、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のCS産生遺伝子を含む約4.8キロベースのDNA断片に含まれている約3.2キロベースのBamHI断片が組込まれた複合ブ

ラスミドである。得られたプラスミドpAG4002の制限酵素切断地図を第17図に示す。

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAG4002)について、前記実施例3-(1)-(6)の方法によりCS活性を測定した結果、第10表に示した様に高いCS比活性が認められた。故に、プラスミドpAG4002に含まれている3.2キロベースのBamHI断片には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のCS産生遺伝子が含まれていることは明らかである。

#### (B) CS産生遺伝子を含む約3.2キロベースのDNA断片の縮小化

前記実施例3-(1)-(7)で調製したプラスミドpAG4002のDNA 5μgに対して、20単位の制限酵素SalIを加えて、50mM Tris-HCl(pH7.4)、10 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mM NaClの緩衝液50μl中で37°Cにて2時間反応させた。そこへ等量のフェノール・クロロホルム(1:1 v/v)液を添加して、振拌の後、水層を回収した。更に等量のクロロホルムを添加して振拌の後、水層を回収した。そこへ酢酸ナト

リウムを最終濃度300mMになるように加え、次に2倍量のエタノールを添加して、-30°Cで3時間保持した後、12,000 rpm(8,900 g)で10分間遠心分離してDNAの沈殿を回収し、これを減圧乾燥した。このDNA全量に対して、3単位のT.ファージDNアリガーゼを50 mM Tris-HCl(pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオトレイトル、1 mM スペルミジン、1 mM ATP 0.1 mg/ml BSAの緩衝液50μl中で、15°Cにて一晩反応させた。その後、70°Cにて10分間加熱することにより、反応を停止させた。このリガーゼ反応液を用いて、前記実施例1工程(1)-(8)-①の方法により、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(微生物新規第558号)を形質転換した。

得られたテトラサイクリン耐性形質転換株を、テトラサイクリン10 μg/mlを含む前記LG寒天培地上で純化した後、各株から前記実施例1工程(1)-(8)-①の方法によりプラスミドを分離し、制限酵素としてEcoRI、HindIII、PstI、SalI及びXbaIを用いる以外は前記実施例1-(1)-(6)

と同様の方法によりそれらのプラスミドを解析した。得られたプラスミドをプラスミドpAG4003と命名した。第18図に示した様にプラスミドpAG4003はプラスミドpAG4002の約0.7キロベースのSalI断片が欠失したプラスミドである。

コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pAG4003)について、前記実施例3-(1)-(6)の方法によりCS活性を測定した結果、第10表に示した様に高いCS比活性が認められた。故に、プラスミドpAG4003に含まれている約3.2キロベースのBamHI-SalI断片には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のCS産生遺伝子が含まれていることは、明らかである。

(以下余白)

#### (2) GDH遺伝子、ICDH遺伝子及びCS遺伝子を含む組換え体DNAの作製

前記実施例3-(1)で得られたpAG4003を前記実施例1-(3)に記載と同様の方法で100μgの培養液から約60μg(60 μg/ml)を調製した。またICDH断片およびGDH断片は前記実施例1-(3)の方法に従いそれぞれ約2μgおよび約3 μgを調製後、実施例1-(3)に記載の方法に従いpAG4003のSalI切断点にICDH断片を組み込むことによりpCI31を得た。またpAG4003のEcoRI切断点にGDH断片を組み込むことによりpCG5を得た。pCI31およびpCG5はそれぞれCSとICDHを同時に含む組換えプラスミドおよびCSとGDHを同時に含む組換えプラスミドである。CS+ICDH+GDHの組換えプラスミドはpCI31のEcoRI切断点にGDH断片を組み込むことにより得られ、本発明のプラスミドpCIG231についてさらに詳細な解析を行った。

#### (3)組換え体DNAの解析

前記実施例3-(2)で得られた組換え体DN

A であるプラスミド pCI31, pCG5, および pCIG231 を前記実施例 1 - [3] に記載した方法によりそれぞれの保持菌から調製し、実施例 1 - [1] - [6] に記載の方法に従ってそれぞれの制限酵素による切断点地図を作成した。結果を第 19 ~ 21 図に示す。その結果これら 3 種の組換えプラスミドは全て目的の構造を持っていることが確認された。

#### (4) 酵素活性の測定

前記実施例 1 - [6] 記載の方法に従って pCI31, pCG5, および pCIG231 の各プラスミドを保持する宿主菌 (*Corynebacterium melassecola* 801) よりそれぞれ細胞抽出液を調製し、CS, ICDH, GDH の酵素活性をプラスミドを保持しない宿主菌の細胞抽出液を用いた場合と比較した。CS 活性は、3.0 mM の酵素反応液 (85 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM オキザロ酢酸、0.1 mM 5.5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (DNNB), 0.16 mM アセチル-CoA, 10 μg 細胞抽出液) の 412 nm における吸光度の増加を日立分光光度計 (228 型) で測定することにより求めた。ICDH 活性および GDH 活性

#### 実施例 4

本実施例では、CS, AH, ICDH, および GDH の 4 種の酵素が同時に強化された菌株を作成した例を示す。この場合、4 種の酵素遺伝子を同時に含む組換えプラスミドの構築は、前記実施例 2 と実質的に同様の方法で行った。

##### (1) 組換えプラスミドの作製

まず、前記実施例 2 - [1] に記載の方法で AH 遺伝子を含む約 4.7 kb の XbaI 断片を調製し、約 2 μg の該断片を得た。また、pCIG231 を XbaI で消化することにより得られる 3 断片のうち、約 0.4 kb の断片と約 6.5 kb の断片を pCIG231 DNA 10 μg からそれぞれ約 3 μg および約 2 μg の収量で別個に調製した。得られた 3 種の XbaI 断片 (4.7 kb, 0.4 kb, および 6.5 kb) を全量混合し、1 単位の T4 DNA リガーゼを用いてこれらを結合させた。本リガーゼ反応液を用いてコリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 を形質転換し、得られたテトラサイクリン耐性形質転換株約 300 株についてそれらが各自の保有する組換えプラス

の測定は前記実施例 1 - [6] 記載の方法で行った。

第 1 表

菌株	CS <sup>a)</sup>	ICDH <sup>b)</sup>	GDH <sup>c)</sup>
801 <sup>d)</sup>	0.33	0.82	0.85
801(pCI31)	1.6	3.4	0.85
801(pCG5)	1.7	0.75	3.2
801(pCIG231)	1.1	3.9	2.5

注 1) 第 9 表の注 1) と同じ。

注 2) 第 3 表の注 1) と同じ。

注 3) 第 1 表の注 1) と同じ。

注 4) 第 2 表の注 2) と同じ。

第 1 表の結果により pCI31 保持株、pCG5 保持株、pCIG231 保持株はそれぞれ目的の酵素活性が全て強化されていることが確認された。

(以下余白)

ミドの解析を行い、XbaI 处理により 0.4 kb, 6.5 kb, および 4.7 kb の 3 断片が生じる組換えプラスミドを 14 種選択し、これらのうち更に SalI 处理で 3.4 kb の断片が生じるもの 2 種を目的の組換えプラスミドとして分離した。これらのうち 1 種、pCAIG4 を保有する形質転換株コリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 (pCAIG4) と称する]を培養し、その培養液 200 ml から収量約 100 μg (濃度約 50 μg/ml) のプラスミド pCAIG4 を調製し、制限酵素による切断点地図を作成した。その結果、第 22 図に示したとおり pCAIG4 は pGA50 に CS, AH, ICDH, および GDH の各断片が組込まれた目的のプラスミドであることが確認された。

##### (2) 酵素活性の測定

コリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 およびコリネバクテリウム・メラセコラ (*Corynebacterium melassecola*) 801 (pCAIG4) よりそれぞれ細胞抽出液を調製後、CS, AH, ICDH, および GDH の各酵素活性

を比較した。酵素活性の測定はそれぞれ前記実施例3-(1)、2-(1)及び1-(1)および(2)に記載の方法で行った。第12表にその結果を示すが、コリネバクテリウム・メラセコラ(*Corynebacterium melassecola*)801(pCAIG4)が明らかに目的の4種の酵素が全て強化されていた。

第12表

菌株	C S <sup>(1)</sup>	A H <sup>(1)</sup>	I C D H <sup>(2)</sup>	G D H <sup>(2)</sup>
801 <sup>(3)</sup>	0.46	0.62	0.85	1.1
801(pCAIG4)	2.0	1.9	3.9	2.1

注1)第9表の注1)と同じ。

注2)第6表の注1)と同じ。

注3)第3表の注1)と同じ。

注4)第1表の注1)と同じ。

注5)第2表の注2)と同じ。

## 実施例5

本実施例では、実施例1～4で得られた多重強化株を用いたグルタミン酸発酵の例を示す。これらの菌株の培養は2升ジャーファーメンターを用

g/d<sup>2</sup>になった時点でのニッサンノニオンP-6(日本油脂製)を1g添加し、さらに乾燥菌体量が約1.4g/d<sup>2</sup>になった時点でニッサンカチオンMA(日本油脂製)を0.2g～0.3g添加した。また培養15時間目にベニシリングを4,000単位添加した。培養中の残糖濃度はテクニコン社製オートアナライザーにより適宜測定し、糖濃度45g/d<sup>2</sup>(全糖として)の捕獲液を連続添加することにより培養液の残糖濃度を1-2g/d<sup>2</sup>前後に制御した。尚、粗換えプラスミドの脱落を防ぐため、主培養液と補糖液以外にはテトラサイクリンを10μg/ml添加した。培養は36時間行い、培養終了後、各菌株培養液の一部を取り、L-グルタミン酸の濃度をテクニコン社製オートアナライザーを使用して測定した。また、それまでの全使用糖量とL-グルタミン酸生産量より収率を求めた。得られた結果を第13表に示す。また、各菌株の培養液1mlを取り、遠心分離により菌体を除去した後、塩酸を加えてpH3.2に調整するいわゆる等電点法により粗グルタミン酸結晶を取得した。その結果、菌株801(pIG104)

い、実際の工業プロセス同様に培養液の残糖濃度を一定に保つように糖液を連続的に添加して行った。

各菌株をそれぞれ50mlのケーン魔糖液4g/d<sup>2</sup>(全糖として)、尿素0.8g/d<sup>2</sup>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g/d<sup>2</sup>、リン酸 0.15g/d<sup>2</sup>(殺菌前pH 7.0、120℃20分殺菌)を含む培地に接種し、32℃で18時間培養後、その全量をケーン魔糖液5.4g/d<sup>2</sup>(全糖として)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g/d<sup>2</sup>、リン酸 0.23g/d<sup>2</sup>(殺菌前pH 8.0、120℃30分殺菌)を含む培地1Lを含む2升ジャーファーメンターに接種し、32℃、800rpm、1vvm pH 7.8(アンモニア水で自動調整)の条件で培養した。乾燥菌体量が約1.5g/d<sup>2</sup>になった時点での(約7時間)培養液40mlを主培養液に接種した。主培養はケーン魔糖液8g/d<sup>2</sup>(全糖として)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g/d<sup>2</sup>、リン酸 0.213g/d<sup>2</sup>、120℃20分殺菌の培地1Lを含む培地2升ジャーファーメンターを用いて、32-34℃、800 rpm、1 vvm、pH 7.3(アンモニア水で自動調整)の条件で行い、乾燥菌体量が約1.2

、801(pIG321)、801(pCIG231)および801(pCAIG5)から粗グルタミン酸結晶をそれぞれ76g、71g、79gおよび78gが得られた。

第13表

菌株	グルタミン酸 <sup>(1)</sup> 濃度(g/d <sup>2</sup> )	対糖収率(% <sup>(2)</sup> )
801 <sup>(3)</sup>	9.1	52
801(pIG1001)	9.2	54
801(pIG3001)	9.1	54
801(pIG4003)	9.2	53
801(pIG5001)	9.2	53
801(pIG101)	10.8	57
801(pIG321)	10.6	58
801(pCIG31)	9.1	54
801(pCG5)	9.3	56
801(pCIG231)	11.2	60
801(pCAIG4)	11.2	61

注1)テクニコン社製オートアナライザーを使用して測定した。

注2)グルタミン酸生成量(g)/使用糖量(g)×100

注3)第2表の注2)と同じ。

第13表から明らかなように、少なくともG D HとI C D Hの両酵素が同時に強化された菌株では、他の菌株に比較してグルタミン酸蓄積量、対糖収率ともに高い成績を示した。

#### (発明の効果)

本発明によりL-グルタミン酸を大量蓄積する新規なグルタミン酸生産性コリネ型細菌が供給され、またその細菌を用いることによりL-グルタミン酸を大量に製造することが可能になった。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は組換えプラスミドpAG103の、第2図はpAG1の、第3図はpAG14の、第4図はpAG3の、第5図はpAG50の、第6図はpAG1001の、第7図はpAG302の、第8図はpAG303の、第9図はpAG311の、第10図はpAG3001の、第11図はpAG101の、第12図はpAG501の、第13図はpAG5001の、第14図はpAG32の、第15図はpAG401の、第16図はpAG4001の、第17図はpAG402の、第18図はpAG4003の、第19図はpCI31の、第20図はpCG5の、第21図はpCIG231の、第22図はpCI

IG4の制限酵素切断地図をそれぞれ示す。図中の英文字はそれぞれ下記の制限酵素による切断点を示す。

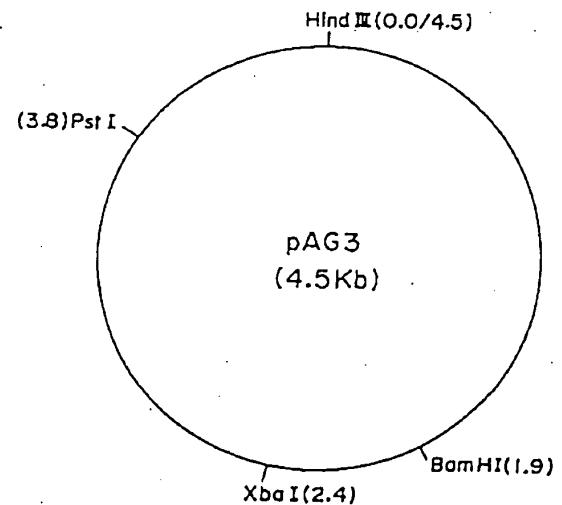
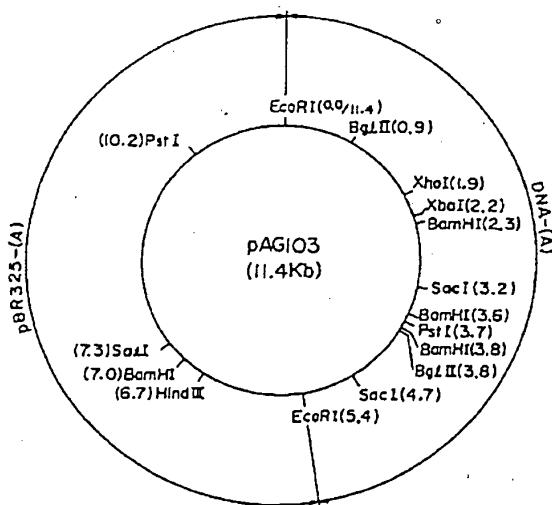
B: BamHI, E:EcoRI, H:HindIII,  
P:PstI, S:Sall, X:XbaI

第6、10、11、13、14、18、19、20、21及び22図中、内側の円と数字は各プラスミドの基準となるXbaI切断点からの距離をキロベース(kb)で示している。AH, CS, ICDH, GDHはそれぞれAH遺伝子を含むDNA断片、CS遺伝子を含むDNA断片、ICDH遺伝子を含むDNA断片、GDH遺伝子を含むDNA断片であることを示している。また、第1図においてDNA-(A)はGDH遺伝子を含むDNA断片、pBR325-(A)はプラスミドpBR325をEcoRIで開鎖したDNA断片を示し、第5図においてDNA-(a)はプラスミドpAG1由来のテトラサイクリン耐性遺伝子含有DNA断片を示す。

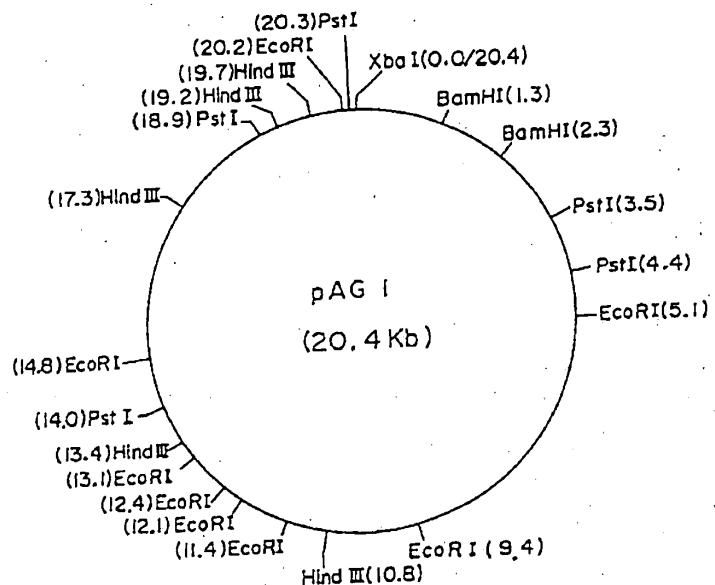
特許出願人 沖化成工業株式会社

## 第4図

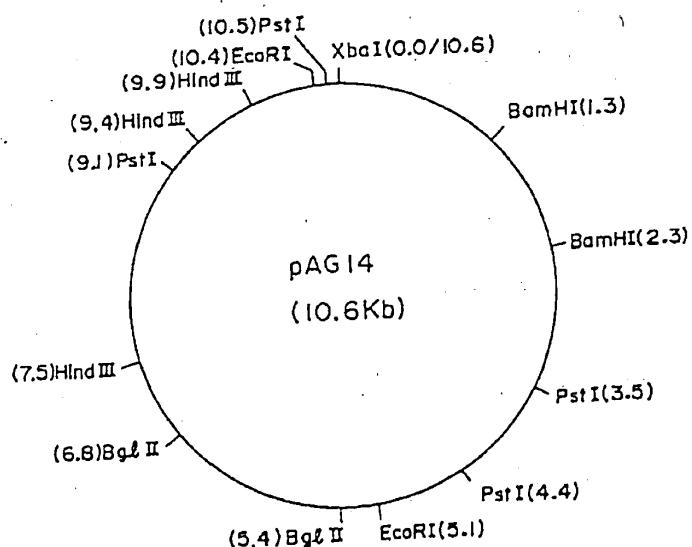
第1図



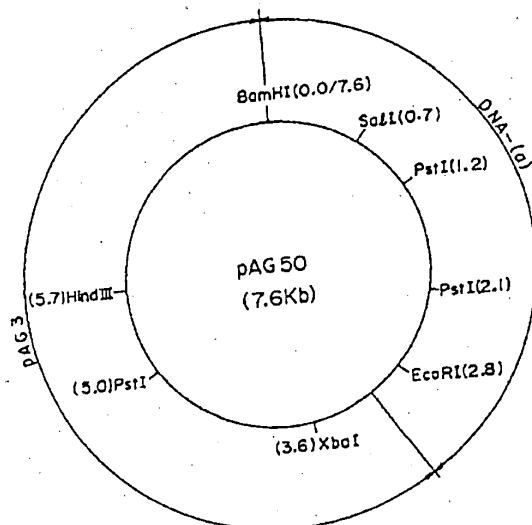
第 2 図



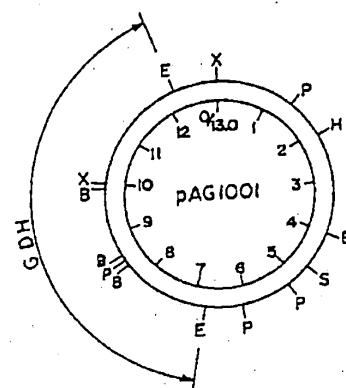
第 3 図



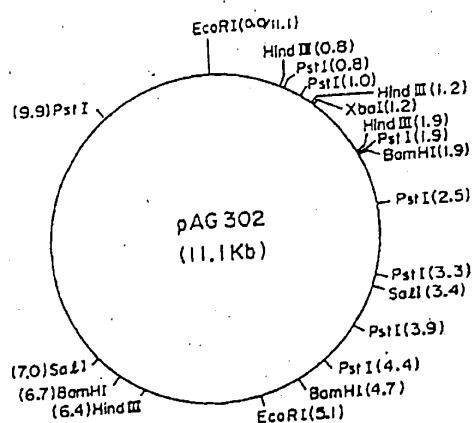
第5図



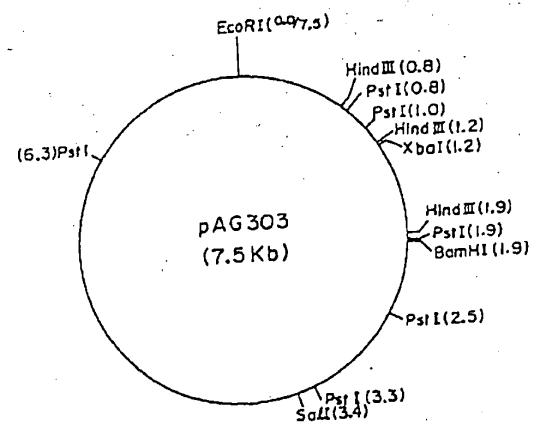
第6図



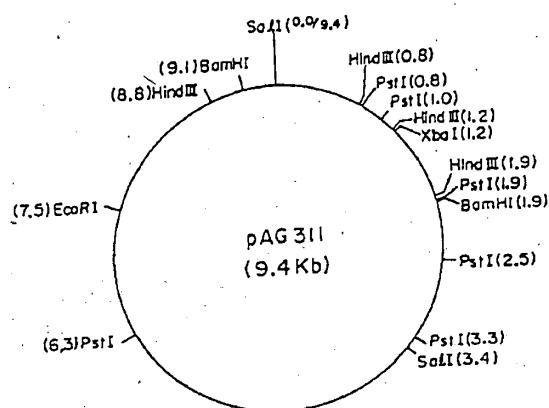
第7図



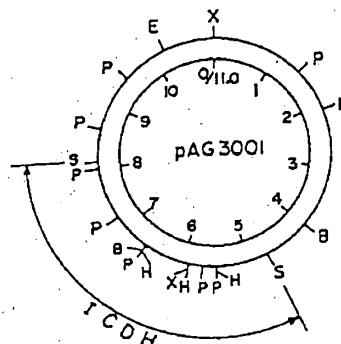
第8図



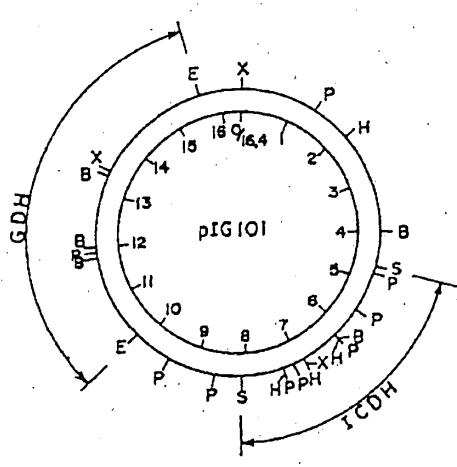
第9図



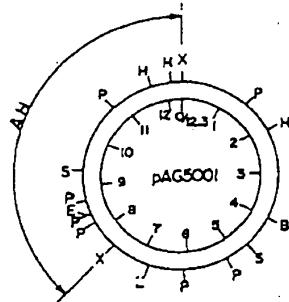
第10図



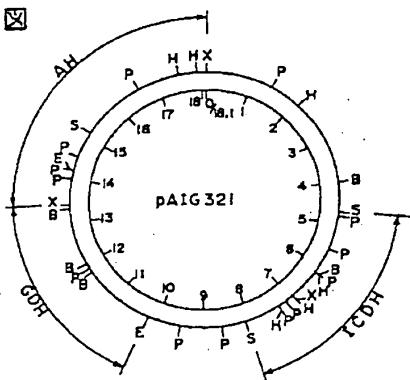
第11図



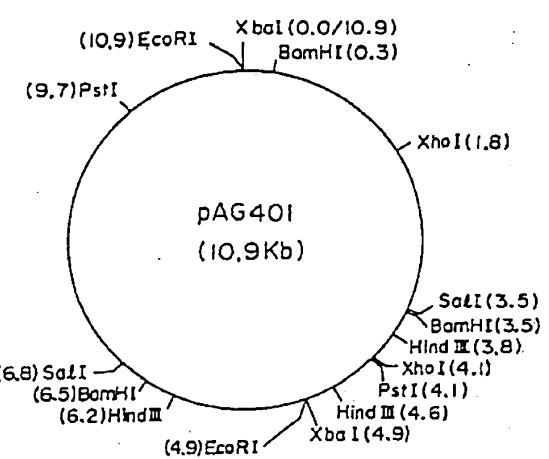
第 13 図



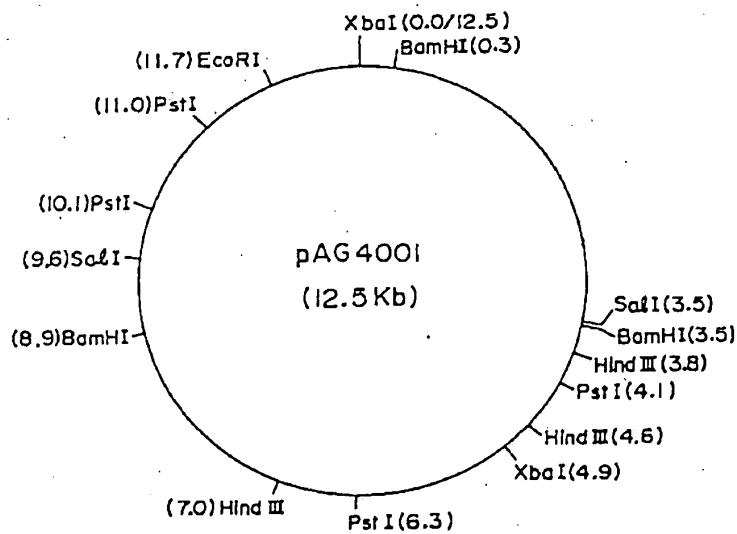
第 14 図



第 15 図

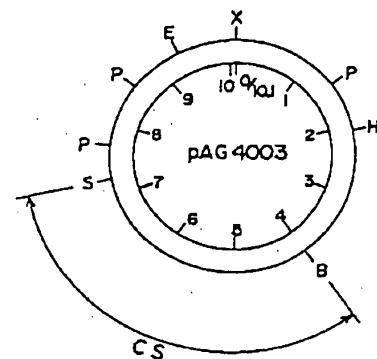
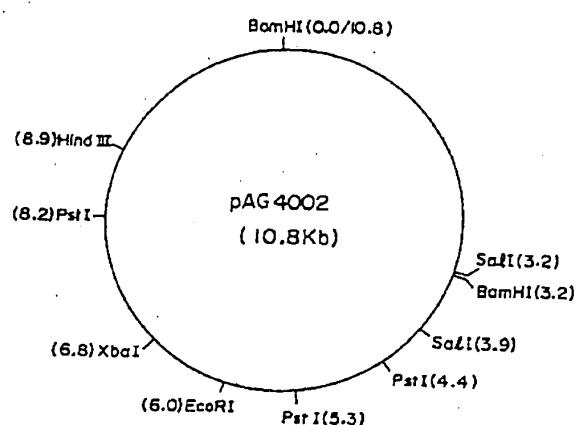


第 16 図

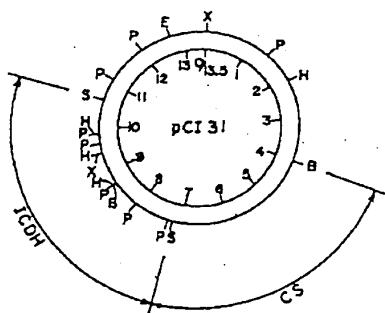


第18図

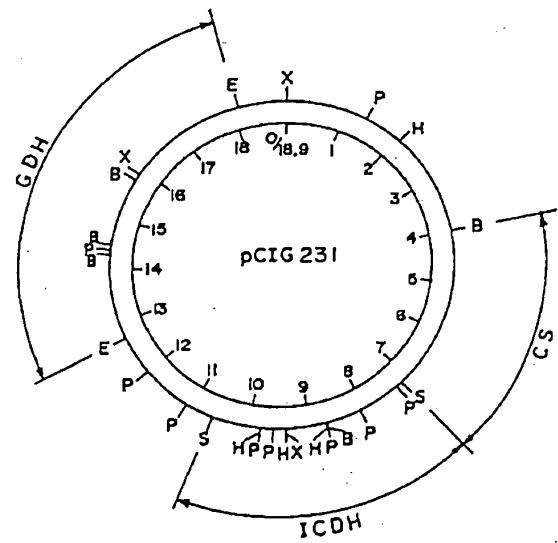
第17図



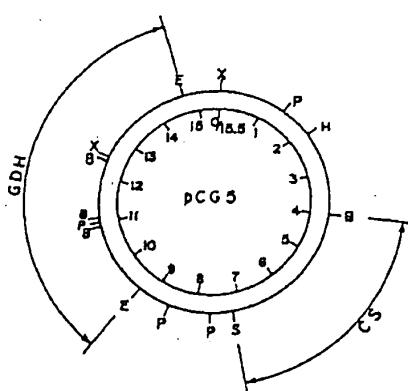
第19図



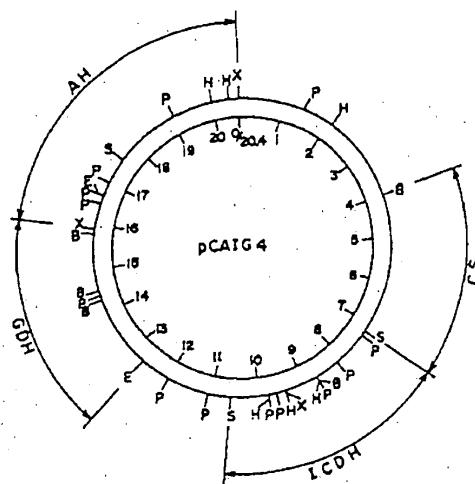
第21図



第20図



第 22 図



第1頁の統計

◎Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 13/14  
(C 12 R 1:15)  
(C 12 P 13/14  
(C 12 R 1:13)  
(C 12 N 1/20  
(C 12 R 1:15)  
(C 12 N 1/20  
(C 12 R 1:13)

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成7年(1995)7月18日

【公開番号】特開昭63-214189

【公開日】昭和63年(1988)9月6日

【年通号数】公開特許公報63-2142

【出願番号】特願昭62-47759

【国際特許分類第6版】

C12P 13/14 2121-4B

C12N 1/20 7236-4B

15/09

//(C12P 13/14

C12R 1:15 )

(C12N 1/20

C12R 1:15 )

【F I】

C12N 15/00 A 9050-4B

手続補正書(自発)

平成5年12月17日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許第47759号

2. 発明の名称

新規なグルタミン酸生産性コリネ型細菌及び  
該細菌を用いるレーグルタミン酸の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪府大阪市北区生島浜1丁目2番6号

(003) 旭化成工業株式会社

代表取締役 弓倉 礼一

4. 補正命令の日付

自発

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄及び  
「図面の簡単な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第7頁第4行～第5行の「(特願昭  
60-8158)」を「(特願昭61-81

58)」と訂正する。

(2) 明細書第7頁第8行の「オスホエノールビ  
ルピン酸」を「ホスホエノールビルピン酸」  
と訂正する。

(3) 明細書第19頁第2行の「本発明の細菌を  
」を「本発明の細菌の」と訂正する。

(4) 明細書第19頁第19行の「発現」を削除  
する。

(5) 明細書第22頁第13行の「第1図から第  
4図に」を「第6図、第10図、第13図、  
第18図にそれぞれ」と訂正する。

(6) 明細書第23頁第2行の「特願昭60-8  
158」を「特願昭61-8158」と訂正  
する。

(7) 明細書第23頁第13行の「同時に」を削  
除する。

(8) 明細書第23頁第15行の「同時に」を削  
除する。

(9) 明細書第26頁第9行の「25～38℃、  
好ましくは30～40℃」を「25～40℃」

、好ましくは30~38°Cと訂正する。

(10) 明細書第33頁第3行の「米国社より」を「米国より」と訂正する。

(11) 明細書第38頁第1行~第2行の「分離した大腸菌を培養してG DH産生遺伝子をクローニングした。」を削除する。

(12) 明細書第40頁第1表の最下行の「P A 3 4 0 (p A G 1 1 2) + 2 8, 9」を削除する。

(13) 明細書第73頁第5行~第11行の「エシエリヒア・コリ・・・クロラムフェニール20 μg/mℓを添加した。」を削除する。(4)

明細書第74頁第18行の「p A g 3 0 2」を「p A G 3 0 2」と訂正する。

(14) 明細書第76頁第17行の「Esc-h  
richia」を「Escherichia」と訂正する。

(15) 明細書第81頁第3行の「Eco R I 実端」のあとに、「から」を挿入する。

(16) 明細書第117頁第10行の「LMアガロ

ース」を「LMPアガロース」と訂正する。

(17) 明細書第119頁第15行の「DNAの試料X II」を「DNA試料X II」と訂正する。

(18) 明細書第132頁最下行の「実施例1-(2)」を「実施例2-(1)-(8)」と訂正する。

(19) 明細書第133頁第3行の「実施例1-(2)」を「実施例2-(1)-(8)」と訂正する。

(20) 明細書第133頁第16行の「実施例1-(3)」を「実施例2-(1)-(8)」と訂正する。

(21) 明細書第133頁最下行の「実施例1-(3)および1-(4)」を「実施例2-(1)-(9)および2-(1)-(10)」と訂正する。

(22) 明細書第158頁第15行~第16行の「実施例1-(1)-(1)」を「実施例1-(1)-(8)」と訂正する。

(23) 明細書第161頁第15行の「実施例2-

(2)」を「実施例1-(1)-(9)」と訂正する。

(25) 明細書第175頁第17行の「第14図はp A I G 3 2 の、」を「第14図はp A I G 3 2 1 の、」と訂正する。

以上